



TITLE:

# 血液適合性セルロース透析膜に関する研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

日吉, 辰夫

---

CITATION:

日吉, 辰夫. 血液適合性セルロース透析膜に関する研究. 京都大学, 1998, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1998-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3135674>

RIGHT:

血液適合性セルロース透析膜に関する研究

日吉 辰夫

1998 年

# — 目 次 —

## [第 1 章] 序論

1 - 1 . 本研究の背景と目的	1
1 - 2 . 本論文の概要	3

## [第 2 章] 血液透析膜の付着蛋白に関する検討

2 - 1 . 緒言	8
2 - 2 . 実験方法	
2 - 3 . 結果	10
2 - 3 - 1 . 各種透析膜の脱離蛋白量	
2 - 3 - 2 . 脱離蛋白の電気泳動	
2 - 3 - 3 . 共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察	
2 - 4 . 考察	15

## [第 3 章] 血液透析膜の構造と溶質透過性

3 - 1 . 緒言	17
3 - 2 . 血液透析膜設計の要点	
3 - 2 - 1 . 生体適合性	
3 - 2 - 2 . 透析性能の制御	
3 - 3 . 構造解析	26
3 - 4 . 纏め	29

## [第 4 章] 銅アンモニアセルローズ溶液の凝固における

### 界面電位の役割

4 - 1 . 緒言	31
4 - 2 . 実験方法	32
4 - 2 - 1 . 銅アンモニアセルローズ溶液の調整	
4 - 2 - 2 . 凝固液と凝固速度	
4 - 2 - 3 . 銅アンモニアの移動流束	

4 - 2 - 4 . 界面電位の測定	
4 - 3 . 結果	3 3
4 - 4 . 考察	3 4

[第 5 章] 再生セルロース膜の製膜技術と孔構造設計

5 - 1 . 緒言	4 3
5 - 2 . 再生セルロース中空糸膜の紡糸プロセスと構造制御	
5 - 3 . 膜孔構造のバリエーション	4 5
5 - 4 . セルロース膜の生体適合性技術	5 0
5 - 5 . 纏め	5 3

[第 6 章] 対称グラジエント型セルロース血液透析膜の  
構造と特性について

6 - 1 . 緒言	5 4
6 - 2 . 孔構造制御原理	
6 - 3 . 血液透析膜の孔構造設計	5 5
6 - 4 . 解析方法	5 6
6 - 4 - 1 . 試験サンプル	
6 - 4 - 2 . 孔構造観察と孔径分布測定	
6 - 4 - 3 . 溶質透過係数の測定	
6 - 4 - 4 . 篩い係数の測定	
6 - 4 - 5 . 溶質透過流速の測定	
6 - 4 - 6 . 蛋白補足量の測定	
6 - 4 - 7 . 湿潤強度の測定	
6 - 5 . 結果と考察	6 0
6 - 6 . 纏め	6 7

[第 7 章] 高透過性 P E G グラフト再生セルロース膜” B C - F ”  
の特徴と臨床性能

7 - 1 . 緒言	6 8
------------	-----

7 - 2 . 試験方法	6 9
7 - 2 - 1 . 試験サンプル	
7 - 2 - 2 . 臨床試験	
7 - 2 - 3 . 篩い係数の測定	
7 - 2 - 4 . 原子間力顕微鏡による中空糸内表面観察	
7 - 3 . 結果	7 0
7 - 4 . 考察	7 1

[第 8 章] 高透過性 P E G 鎖グラフト再生セルロース膜の  
生体適合性

8 - 1 . 緒言	8 1
8 - 2 . 実験方法	8 2
8 - 2 - 1 . PEG 鎖グラフトサンプルの作製	
8 - 2 - 2 . 測定用サンプルモジュールの作製	
8 - 2 - 3 . 血小板付着量の測定法	
8 - 2 - 4 . 接触相凝固活性の測定	
8 - 2 - 5 . 補体活性の測定	
8 - 3 . 結果	8 3
8 - 4 . 考察	8 5

[第 9 章] 結論

[公表論文リスト]

[謝辞]



# 第 1 章 序 論

## 〔 1 - 1 〕 本 研 究 の 背 景 と 目 的

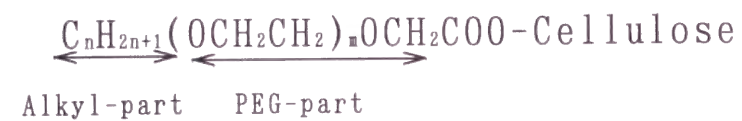
腎不全患者の体内に蓄積した老廃物や尿毒症病因物質を、体外循環している血液から透析膜を用いて透析液中に排泄し、浄化された血液を再び体内に戻すことによって患者の生命を維持するのに用いられるのが血液透析器である。透析器にはコイル型、積層型、中空糸型があるが、現在では中空糸型が主に用いられている。我が国の慢性透析患者数は約16万人に達し、使用される透析器は約2,000万本／年に及んでいる。今日の血液透析用中空糸膜素材は多種多様であり、再生セルロース、酢酸セルロースといったセルロース系の透析膜、ポリメチルメタクリレート(P M M A)、エチレンビニルアルコール共重合体(E V A L)、ポリアクリロニトリル(P A N)、芳香族ポリスルホン、芳香族ポリアミドなどの合成高分子による透析膜が開発され用いられている。その中で、再生セルロースは血液透析器に求められる基本機能である水分の除去、尿素等の低分子量の蛋白代謝物の除去に優れた特性を有しており、血液透析用の膜素材として最も古くから用いられ、長い使用実績に基づく信頼性の高さから現在でも透析膜素材の主流の地位を占めている。

しかしながら、その一方で、その生体適合性については早くから議論され、補体活性化による一過性白血球減少症(ロイコペニア)の発症などが指摘されてきた。又、手根管症候群(C T S)に代表される長期透析に伴う合併症の原因物質である低分子量蛋白  $\beta_2$ -ミクログロブリン(M.W.=11,800)の除去能不足も指摘され、従来よりもカットオフポイントが高い高透過性再生セルロース膜の開発が強く求められている。

このような状況の中で、本研究では、生体適合性に優れ、且つ十分な透過性を有する再生セルロース透析膜の開発を目的として、再生セルロース

膜素材の生体適合性の改良と高透過性膜の製造のための膜構造形成メカニズムについて研究を行なった。

セルロースによる補体の活性化は、セルロースの水酸基が補体と結合することにより引き起こされることが知られている。ロイコペニアはこの活性化補体により引き起こされるものと考えられている。セルロース膜表面に下記のアシルポリエチレングリコール鎖（PEG鎖）をグラフト結合させた改質セルロース膜は補体 C 3 a，C 5 a（補体活性時に発生する分解産物）の産生を効果的に抑制し、一過性白血球減少症（ロイコペニア）を抑制することが知られている<sup>1)</sup>。



後頁の図 1－1，図 1－2 に示すように P E G 鎖のグラフト結合量の増加に伴って、ロイコペニアおよび補体 C 3 a 濃度の上昇は抑制されることが解る<sup>1)</sup>。更に、抗血栓性の向上<sup>2)</sup>や顆粒球エラスターゼの抑制<sup>3)</sup>、また透析時に必要な抗凝固剤の使用量を抑えた省ヘパリン透析<sup>4)</sup>が可能であることも報告されており、この技術によって再生セルロース膜の生体適合性は大きく改善された。

一般に、材料の生体適合性は界面的適合性とバルクの適合性の 2 つに大別される。P E G 鎖グラフト改質法は前者の界面的適合性の範疇で理解されるものである。後者のバルクの適合性は、通常は材料全体のデザインや力学的特性に関するものであるが、本研究においては中空糸膜の膜壁孔構造も広義のバルクの適合性の範疇と位置付けた。何故ならば、膜中に捕捉・滞留（いわゆる「目詰まり」）された蛋白の変成や、生理活性物質の放出も報告されており、透過性の制御と同時に、血中蛋白の膜中捕捉・滞留や膜

面付着量を極小化する観点での膜壁孔構造の設計が重要であるからである。

かかる観点から、本研究では再生セルロース膜の小分子量蛋白の透過性改良と同時に、血液透析膜に求められる理想的な孔構造の追求と実現を目指した。即ち、生体適合性と透過性の両者を同時に満足し得る再生セルロース透析膜の実現が本研究の目的である。

再生セルロース膜は、銅アンモニアセルロース溶液を湿式紡糸することにより製膜される。透析膜としての多孔質構造は、湿式凝固の過程で成長したポリマー粒子が連なることによって多孔質のマトリックス構造が形成されている。このマトリックス構造の設計が孔構造の制御において重要な役割をはたしている。透析膜の透過性、分画性の制御にはこの凝固メカニズムの理解と把握が不可欠であるが、未だ指導的な原理は提案されていない。従って筆者らは、銅アンモニアセルロース溶液の凝固速度と、セルロース溶液と凝固電解質水溶液間に生じる界面電位との関係に着目した研究を行い、この結果に基付いて種々の孔構造を持った透析膜を作製し、それぞれの特性を明らかにした。

## 【 1－2 】 本論文の概要

本論文は「第 1 章 序文」に続いて、第 2 章から第 9 章までの 8 章で構成されている。

第 2 章では、血液透析膜の生体適合性を考える上で重要な要素となる透析膜素材と血液中蛋白との相互作用の強さの評価を試みた。血液透析に使用される各種の中空糸膜について、血漿を循環させた後に中空糸膜表面或いは膜中に付着した蛋白の量と、その付着強度や捕捉強度を脱離条件を変えることによって評価した。又、膜から脱離された蛋白の電気泳動解析により、膜素材と付着蛋白種の間関係を調べた。更に、蛍光標識された蛋白を循環させた中空糸膜の共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察を行い、付着蛋白の存在状態を視覚的に解析した結果を纏めている。

第3章では、ポリエチレングリコール(P E G)鎖グラフト再生セルロース膜の補体活性の抑制、及びロイコペニア抑制の結果と、再生セルロース中空糸膜の構造制御の考え方、及び膜壁孔構造の解析手法として、電子顕微鏡写真の画像解析による方法と、X線小角散乱による方法について研究を行った結果を纏めた。

第4章は、再生セルロース中空糸膜の構造形成法と製造法の基礎理論として、銅アンモニアセルロース溶液の凝固における界面電位の役割について研究した結果を纏めたものである。銅アンモニア溶液と凝固液である各種電解質溶液の界面に発生する界面電位差は拡散電位として解釈され、凝固のメカニズムはこの発生電位によって3つのグループに分類し得ることを明らかにした。

第5章では「再生セルロース膜の製膜技術と孔構造設計」として、前章の研究結果に基づく製膜方法により作製された種々の膜壁孔構造、即ち「均一構造」、「グラジエント構造」、「逆グラジエント構造」、「対称グラジエント構造」の中空糸膜についての透過特性、特に透過の異方性を比較評価し、血液透析膜として求められる孔構造について考察した。更に、セルロース膜表面にグラフトしたP E G鎖が形成する「散漫層」を分子動力学法により計算機シミュレーションを行い、膜表面に形成された厚みが約25 nmの「水和ゲル層」、即ち「散漫層」の存在を検証した。

第6章は、対称グラジエント型孔構造を持った再生セルロース中空糸膜の構造解析と物質透過性、及び機械強度に関する研究の結果を纏めたものである。膜壁サンプルの透過型電子顕微鏡写真の画像解析により、「対称グラジエント型孔構造」が確認された中空糸膜の溶質透過係数、篩係数と透過異方性、及び透過流束と機械強度の関係を明らかにした。

第7章は、P E G鎖グラフト改質により生体適合性を改良し、且つ透過性能を改良した生体適合性高透過型再生セルロース膜のin-vitro評価の結果と、臨床性能をまとめたものである。この中空糸膜の内表面を原子間

力顕微鏡で観察した結果、従来の中空糸膜に較べると表面の平滑性が極めて高いことが確認され、表面平滑性と生体適合性の関係についても考察している。

第8章は、前章と同様にP E G鎖グラフト高透過性再生セルロース膜の生体適合性についてのin-vitro評価に関するものであり、血小板活性、接触相活性、補体活性の挙動について研究した結果を纏めたものである。血小板活性度の研究方法として、従来は素材表面に粘着された血小板を電子顕微鏡観察することにより定性的に評価する方法が用いられて来たが、本研究では粘着血小板の細胞壁を破ることによって放出されるLDH(Lactate dehydrogenase)活性を定量することによって、中空糸膜の血小板活性度を定量的に評価する新たな方法を確立した。

そして、最後の第9章では、本研究の目的である生体適合性と高透過性の両者を同時に満足する再生セルロース膜についての結論を纏めたものである。

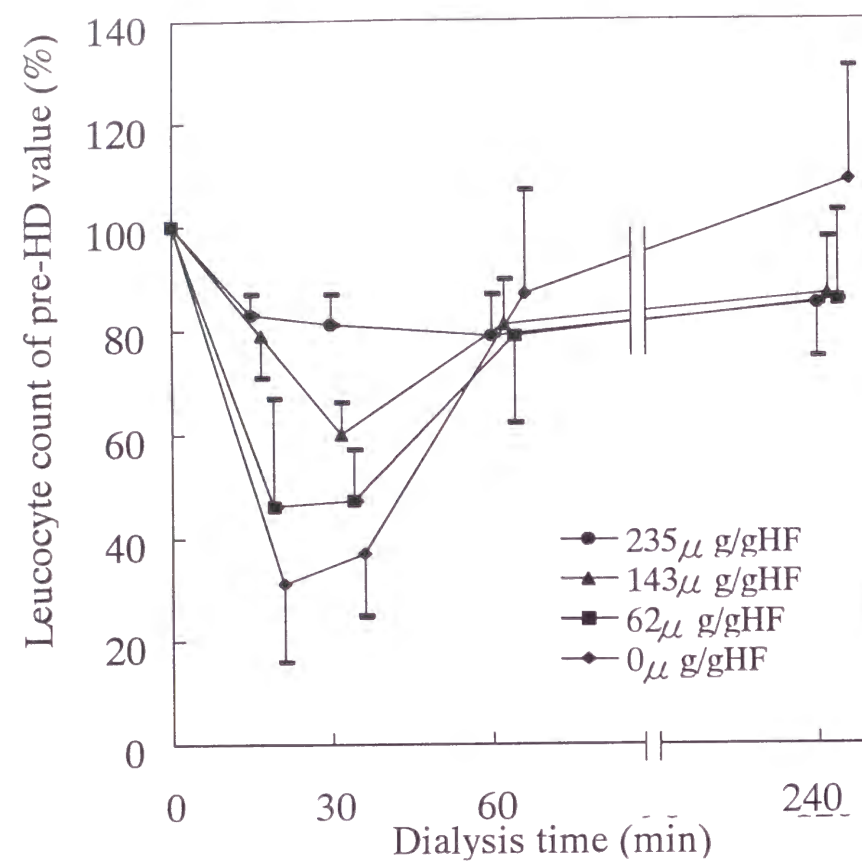


図1-1. 白血球数経時変化のPEG鎖グラフト量依存性

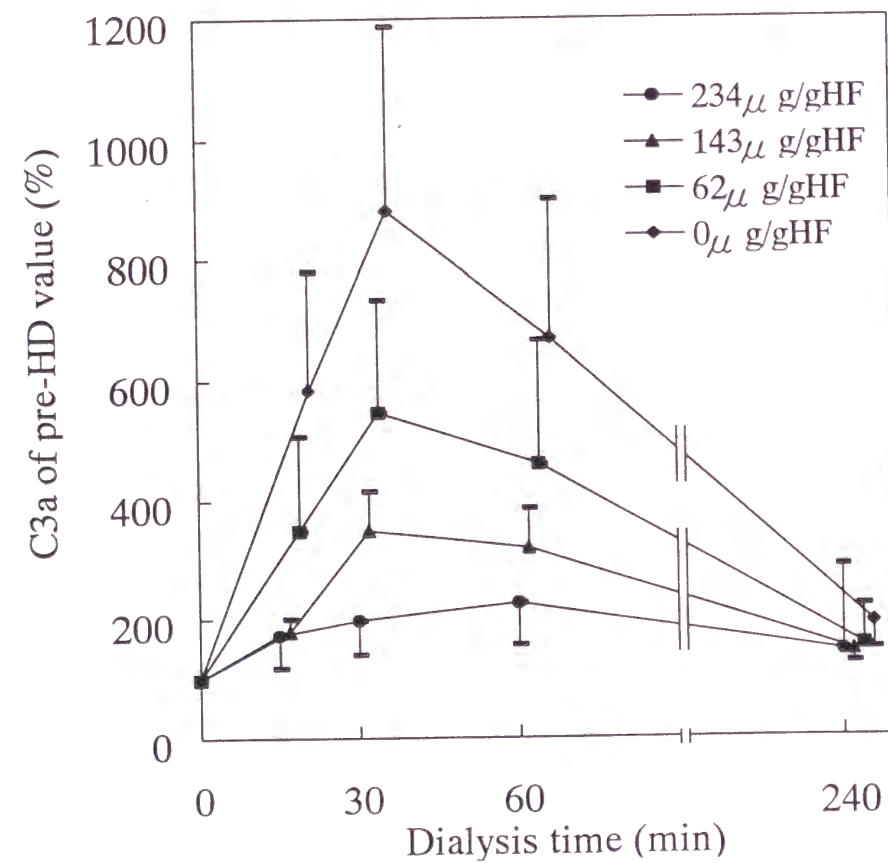


図1-2. 補体C 3a経時変化のPEG鎖グラフト量依存性

#### 参考文献

- 1) 伊藤克佳, 森本嘉純, 秋澤忠男, 越川昭三, 他  
: 腎と透析, 36別冊, 124(1994)
- 2) 中村義弘, 安藤亮一, 小倉三津雄, 中川成之輔, 他  
: 人工臓器 21(3), 834(1992)
- 3) 田畑一秀: 腎と透析, 36別冊, 115 (1994)
- 4) 福井博義, 早野恵子, 三浦 洋, 金子由美, 他  
: 透析会誌 26(7), 1267(1993)
- 5) 伏見文良, 渡辺哲夫, 日吉辰夫  
: Polymer Preprints Japan, 43(3), 1087(1994)



## 第 2 章 血液透析膜の付着蛋白に関する検討

### [ 2 - 1 ] 緒 言

透析膜が血液と接触すると、表面はただちに蛋白質に覆われ、その後血小板、リンパ球、白血球、マクロファージなどの細胞レベルの相互作用が引き続いて起こると考えられている。したがって、透析膜の生体適合性を考えるうえで膜と付着蛋白の相互作用を調べることは極めて重要である。透析膜に付着した蛋白の研究としては、従来から膜に付着した蛋白を脱離させて解析を行った結果が数多く報告されている<sup>1~4)</sup>。しかし、脱離された蛋白には膜との相互作用の強いものや弱いものが入り交じっているため、付着蛋白について論じる場合には、蛋白の種類だけでなく付着状態、即ち膜素材との相互作用の強さも考慮に入れる必要がある。そこで本研究では付着蛋白の膜からの脱離方法を変えることにより膜素材との相互作用の状態を解析した。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて膜内に付着している蛋白の存在状態の違いを視覚的にとらえることを検討した。

### [ 2 - 2 ] 実験方法

#### 2 - 2 - 1 . 使用透析膜

① U P 膜：再生セルロース膜、A M - U P - 1 5 （旭メディカル社製）

② B C - P 膜：再生セルロース膜にポリエチレングリコール鎖をグラフトさせた P C 膜、A M - B C - 1 5 0 P （旭メディカル社製）

③ C T A 膜：セルローストリアセテート膜、F B - 1 5 0 E （ニプロ社製）

④ P S 膜：ポリスルホン膜、A P S - 1 6 （旭メディカル社製）

⑤ P M M A 膜：ポリメチルメタクリレート膜、B K - 1 . 6 U （東レ社製）

以上の 5 種類の透析器から取り出された中空糸でミニモジュール（200filament×16cm）を作製し測定に供した。

#### 2 - 2 - 2 . 方 法

##### 1 ) 牛血漿調整

ヘパリン加新鮮牛血液（10,000ヘパリン単位／L）を 2 回遠心分離しその血漿成分を使用した。

##### 2 ) 血漿蛋白の膜付着方法とサンプル調整

ミニモジュール内に作製した牛血漿を 37℃で 4 時間循環させ、透析膜に蛋白を付着させる。循環後、牛血漿がミニモジュール内に入った状態で細断し、そのモジュールを過剰量の生理食塩水中に加え静置拡散的に内部を洗浄する。その操作を 3 回繰り返して蛋白脱離前のミニモジュールとした。

##### 3 ) 蛋白の脱離方法

脱離前のミニモジュールについて以下の 2 通りの方法で蛋白脱離の操作を行った。①物理的脱離：ミニモジュールを過剰量の注射用蒸留水中で 18 時間振とうさせ、物理的に蛋白を脱離させた後に濃縮して測定に用いた。② S D S 脱離：付着した蛋白を栗山らの方法<sup>2)</sup>により S D S 界面活性剤で強制的に脱離した。

##### 4 ) 蛋白付着量の測定と電気泳動解析

脱離した蛋白は栗山らの方法<sup>2)</sup>により付着量測定および電気泳動を行った。また、S D S で蛋白を脱離した後のモジュールについて、酸加水分解後に窒素定量を行い、アルブミン中の窒素含量を 16% として計算し、脱離されずに膜内に残存している蛋白量を求めた。

##### 5 ) 共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察

F I T C 標識したアルブミンと IgG (Organon Teknika N. V-Cappel Product 製) を牛血漿にそれぞれ加え、各々ミニモジュール内を 37℃ 4 時間循環させた後、蛋白脱離前のモジュール、物理的脱離後のモジュールおよび S D S 界面活性剤脱離後のモジュールの 3 種類について共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡（オリンパス社製：G B -200）を用いて蛋白の存在状態を観察した。

## [ 2 - 3 ] 結 果

### 2 - 3 - 1 . 各種膜素材の脱離蛋白量

図 2 - 1 に示すようにセルローズ系膜である UP、BC-P、CTA 膜は、物理的脱離操作によって脱離される蛋白量は変わらなかった。一方、PS、PMMA 膜は、物理的脱離に比べ脱離力の強い SDS 法を用いることにより、各々約 10 倍、60 倍も多く蛋白が脱離された。また、下表 2 - 1 より SDS 脱離させた場合でも、PMMA 膜は  $1.9\text{mg}/\text{cm}^2$  もの蛋白が脱離されずに膜に残っていた。一方、そのほかの膜ではほとんど検出されなかった。

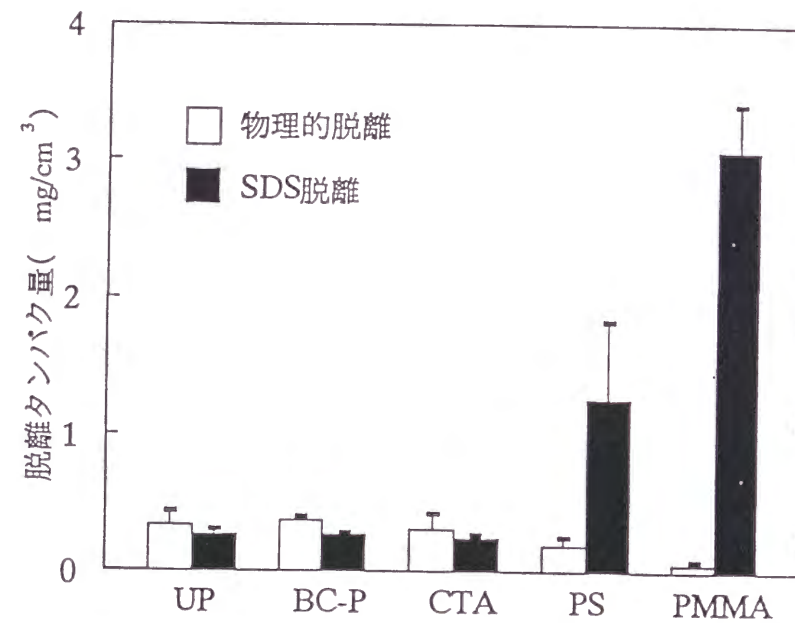


図 2 - 1 各種膜素材の違いによる脱離タンパク量

表 2 - 1 SDS 脱離法でも脱離せず膜に付着しているタンパク量

	UP	BCP	CTA	PS	PMMA
未脱離タンパク量 ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )	ND	ND	ND	0.5	1.9

ND :  $0.4\text{mg}/\text{cm}^2$  以下

### 2 - 3 - 2 . SDS 脱離蛋白の電気泳動

SDS 脱離蛋白の電気泳動結果を図 2 - 2 に示す。ただし、PS、PMMA 膜、牛血漿については、脱離液を希釈したものを用いた。セルローズ系膜 (UP、BC-P、CTA) は使用した牛血漿とほとんど同じ泳動パターンを示したが、PS、PMMA 膜では牛血漿とは量比的に異なるバンドがみられた。また、物理的脱離の場合の電気泳動では PS 膜の脱離蛋白のほとんどがアルブミンであった。

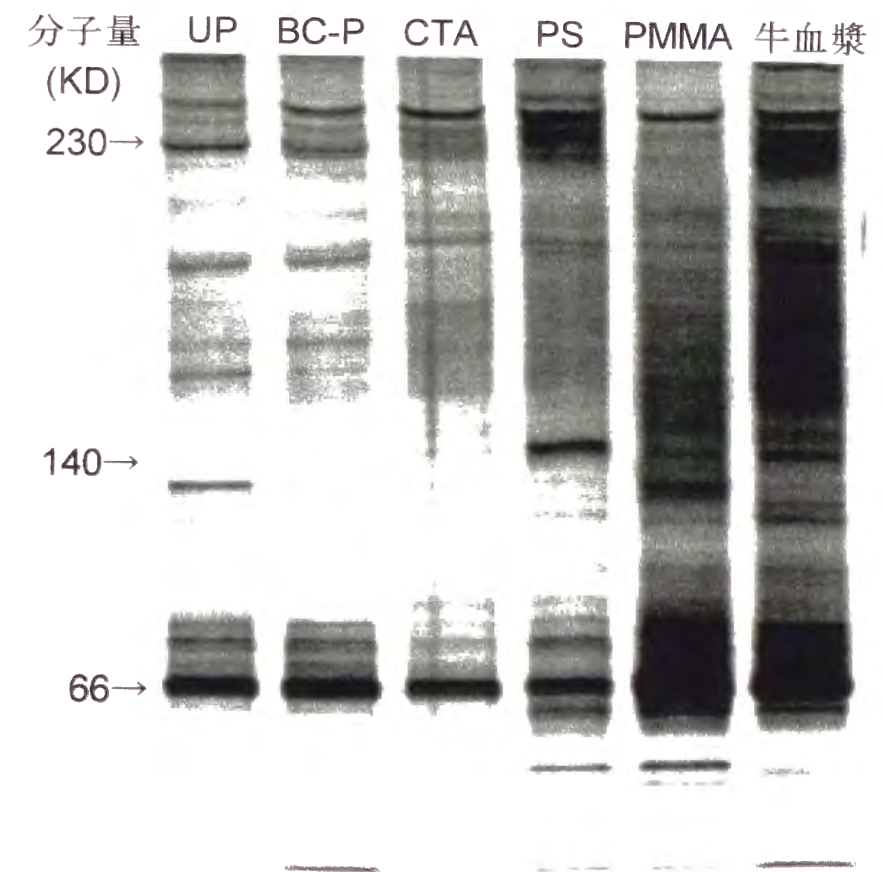


図 2 - 2 . SDS 脱離タンパクの電気泳動

### 2－3－3．共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察

#### 1) F I T C 標識アルブミン

アルブミンの膜への付着状態を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果を図 2－3－a に示す。セルロース系膜（U P、B C－P、C T A）はアルブミンの膜内への浸入が認められたが、物理的な力のみで容易に脱離した。P S 膜は膜表面のみにアルブミンが付着しており物理的な力のみで容易に脱離していた。P M M A 膜は膜表面へのアルブミン付着が観察されたが、S D S 界面活性剤でも殆ど脱離されていなかった。

#### 2) F I T C 標識 I g G

I g G の膜への付着状態を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果を図 2－3－b に示す。U P、C T A 膜はアルブミン同様膜内への浸入がみとめられたが、脱離については S D S 界面活性剤を用いた場合でもあまり脱離されなかった。一方、B C－P 膜はアルブミンの場合と異なり膜内表面近傍に蛍光がみられた。P S 膜は膜内表面に付着していたが、物理的な力では脱離されず、S D S 界面活性剤では脱離された。P M M A 膜は付着も脱離もアルブミンの場合と同様であった。



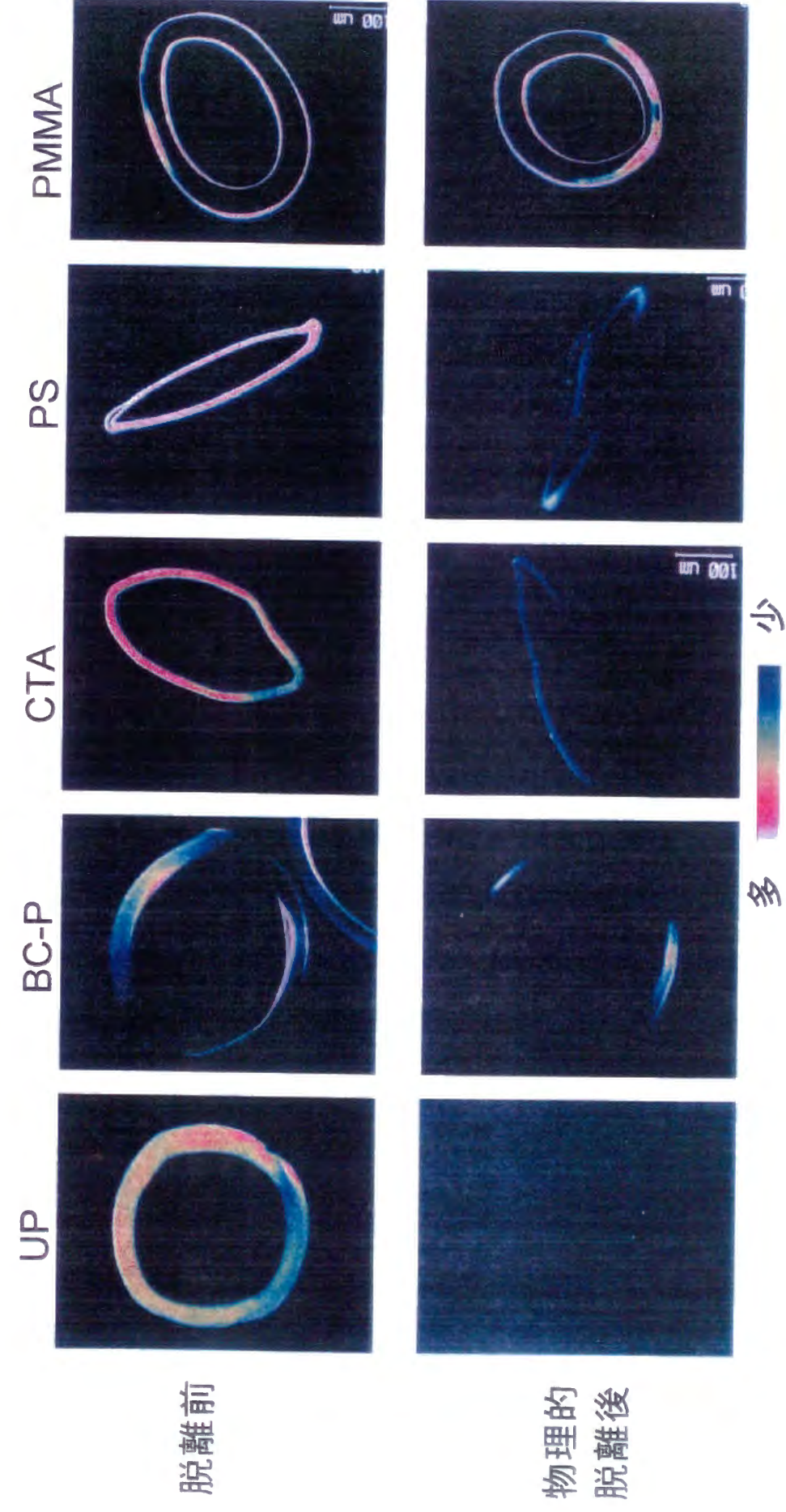
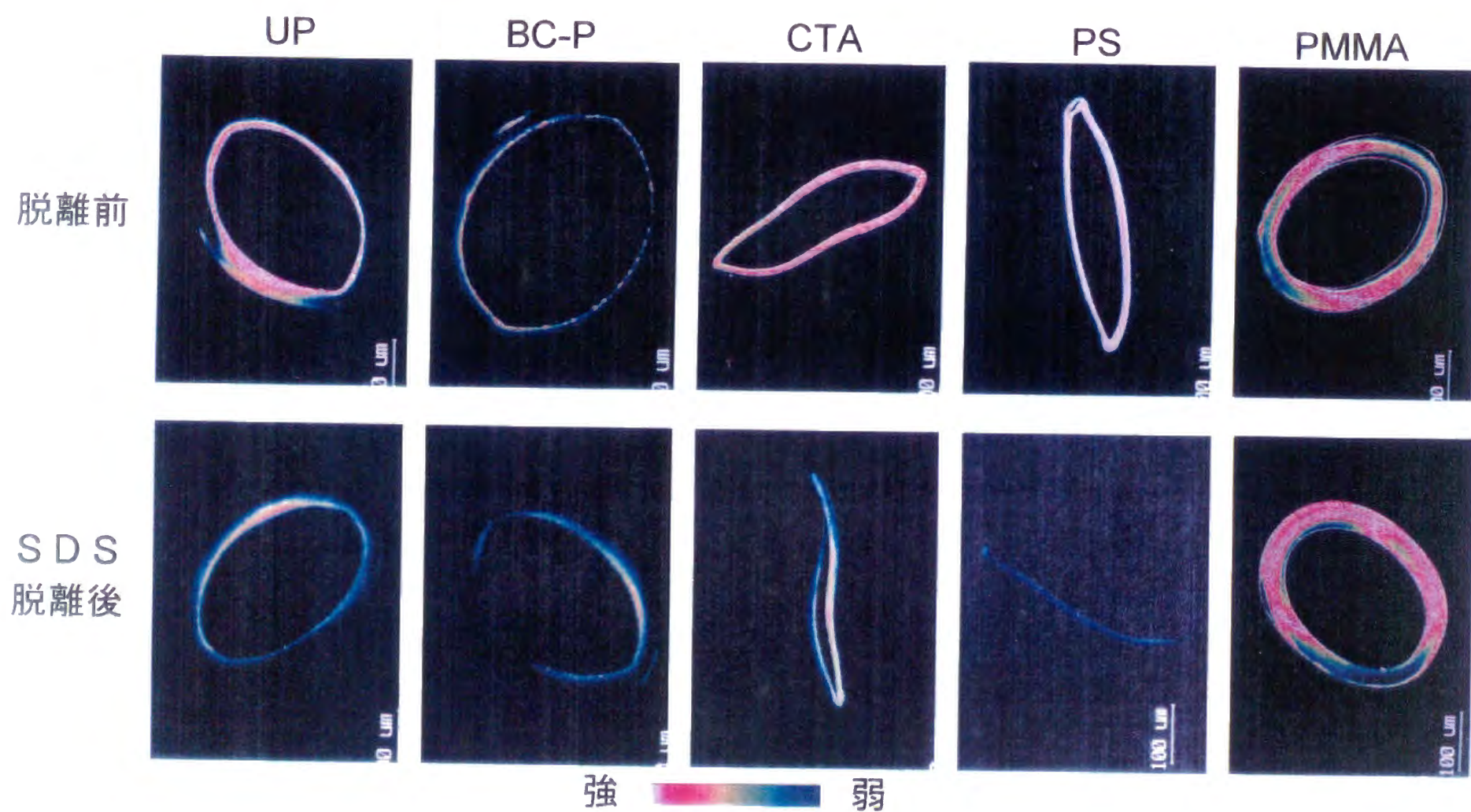


図 2-3-a (a) FITC 標識アルブミン 共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真





(b) FITC 標識 Ig-G

図 2-3-b 共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真

## 〔 2 － 4 〕 考 察

膜と蛋白の相互作用の強さは膜材質により異なる。膜に付着した蛋白と膜素材との相互作用の強さは脱離方法を選ぶことにより見積もることができると考えられる。すなわち、物理的操作のみで脱離される蛋白は非常に弱い相互作用で付着しているものであり、S D S界面活性剤を用いても脱離されずに膜表面に残っている蛋白は非常に強い相互作用で膜に付着しているものと考えられる。

以上の結果より各膜素材の特徴をまとめると、セルロース系膜（U P、B C－P、C T A）は物理的操作のみで容易に蛋白を脱離することができることが明確になった。このことはF I T C標識アルブミンを用いた蛍光顕微鏡観察によっても明らかであった。付着蛋白量についてはP S、P M M A膜に比べ少なく、かつ電気泳動パターンからも特異的な膜への蛋白付着がみられなかった。以上よりセルロース系膜は蛋白との相互作用が非常に小さく、脱離してくる蛋白のほとんどが膜内部に入り込んで物理的にトラップされた状態のものであると考えられる。よって、蛍光顕微鏡観察でみられたI g Gの挙動は、膜内に入り込んで膜から出ていくことのできなくなったものであると考えられる。

P S膜では、蛍光顕微鏡観察より蛋白付着が膜表面のみにみられ、その付着強度は物理的操作のみでアルブミンを容易に脱離することができ、またI g GについてはS D S界面活性剤で脱離することができる程度であった。また表に示されるように未脱離蛋白は少なく、大部分がS D Sで脱離されている。一方、電気泳動パターンより物質的脱離蛋白のほとんどがアルブミンであることから、まず比較的相互作用の強い力で蛋白が膜表面に付着し、その上にアルブミンが非常に弱い力でコートされているのではないかと推定される。

P M M A膜は、表2－1、および蛍光顕微鏡観察結果から非常に強い相互作用で蛋白を膜に付着させていると考えられる。

今回の研究結果より、透析膜から単に脱離した蛋白の解析を行うだけでなく、その脱離した蛋白がどのような付着状態にあったものなのかを解析することが重要であることが示唆された。たとえば、S D S界面活性剤で脱離された蛋白は、

セルロース系膜とPMMA膜では全く意味合いが異なっている。つまり脱離蛋白量および種類だけでなく、脱離前後の存在状態を正確に把握する必要がある。今回用いた共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いての膜への蛋白付着状態を視覚的にとらえることは、付着蛋白の解析にとって非常に有効な手段であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 小篠 栄，他：「各種ダイアライザーの膜表面に吸着するタンパク質の分析」腎と透析,32別冊「ハイパフォーマンスマンブレン'92」8,(1992)
- 2) 栗山兼二郎．他：「各種血液透析における膜付着物の多角的評価研究」人工臓器,21:909.(1992)
- 3) 藤森 明，他：「トリアセテート膜の細孔構造解析と付着物の検討」腎と透析,36別冊「ハイパフォーマンスマンブレン'94」44.(1994)
- 4) 宮崎哲夫，他：「PMMA（BK vs FS-102）の膜吸着と濾過特性の比較」腎と透析,36別冊「ハイパフォーマンスマンブレン'94」90(1994)

## 第3章 血液透析膜の構造と溶質透過性

### [3-1] 緒言

血液透析療法は1914年にAbeらにより試みられて以来、今日までに大きな進歩を遂げてきた。初期においては、血液透析器に求められる機能は水分の除去と、尿素等の低分子量のタンパク代謝物の除去に限られており、もっぱら患者の延命が目的であった。今日では、透析技術の進歩によって、透析期間も10年～20年の長期に及ぶようになり、社会復帰を含む患者のQuality of Lifeへの要求が高まると同時に、長期間透析に伴う合併症が大きな問題となっている。合併症の原因の多くは、従来の透析器では除去することのできなかった尿毒性物質の体内蓄積によるものであるという認識が汎くなされている。特に、1985年、下条らが透析アミロイド症の繊維形成タンパクが $\beta 2$ -ミクログロブリン（ $M_w = 11.8$  KD；以下 $\beta 2$ -MG）であることを見出して以来、 $\beta 2$ -MGをはじめとする低分子タンパク質の除去効率の高い、いわゆる”high performance membrane（HPM）”が開発され急速に普及した。また、血液と膜との接触により引き起こされる種々の反応が観察され、様々な観点からの生体適合性に関する議論が活発におこなわれている。

このような状況の中で、生体適合性に優れ、かつ除去対象物質に応じた孔径を有する透析膜への要求が高まっている。本章では、再生セルロースを素材とした血液透析用中空糸膜の生体適合性の改良と、中空糸膜の構造形成メカニズム、およびその構造解析技術について研究した結果を記す。

### [3-2] 血液透析膜設計の要点

#### 3-2-1. 生体適合性

現在、さまざまな面からの生体適合性の議論がなされている。その代表的な例としては、一過性白血球減少症（ロイコペニア）の抑制、補体成分の活性化の抑制、抗血栓性等が挙げられる。再生セルロース膜は補体を活性化し、透析開始直



後にロイコペニアが生じるという問題が指摘され、生体適合性に劣ると認識されてきた。しかし、我々はロイコペニアおよび補体成分の活性化を抑制する新たな再生セルロース膜であるアルキルポリエチレングリコール（PEG）鎖を膜表面に導入したPC膜を開発した（図3-1）、この膜は筏らによって提唱される散漫層効果によって、その優れた生体適合性の発現機構が説明されている。PC膜を用いた臨床試験の結果を図3-2に示す。従来の再生セルロース膜は透析開始後15分で白血球数は約20%にまで減少しロイコペニアが見られるが、PC膜では白血球の減少がほとんど起きておらず、ロイコペニアの発生が抑制されていることがわかる。同様に透析時の血中補体C3aの濃度上昇もPC膜ではほとんど起きておらず、補体成分の活性化も抑制されていることがわかる<sup>3)</sup>。さらに、PC膜はロイコペニア、補体成分の活性化の抑制だけではなく、タンパク質の吸着量が少ない<sup>4)</sup>、あるいは抗凝固剤として用いるヘパリンの使用量を減らした透析が可能であるとの報告もなされている<sup>5)</sup>。

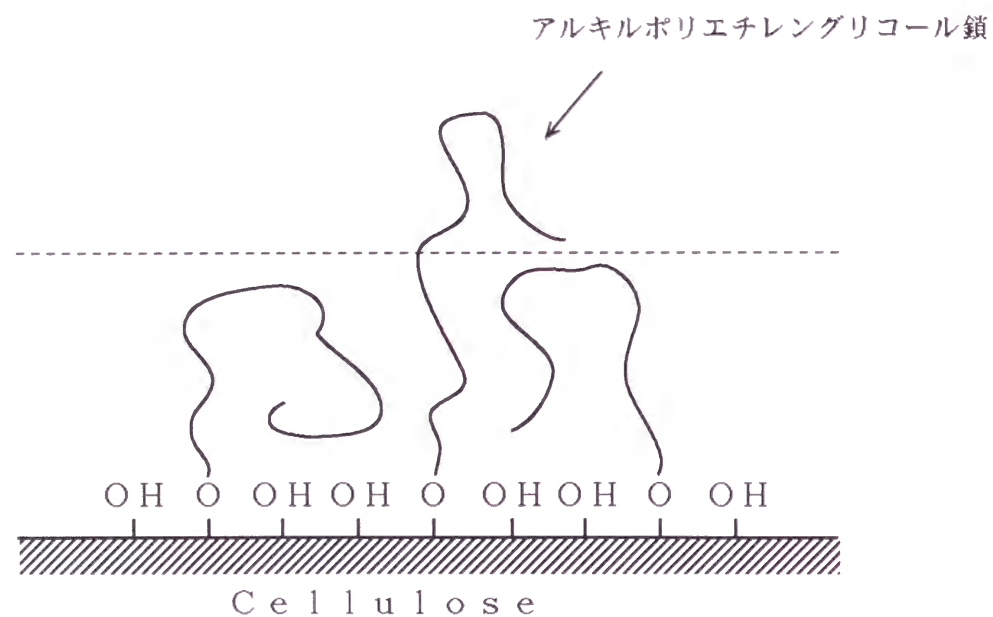


図3-1. PEG鎖グラフトセルロース膜表面の模式図

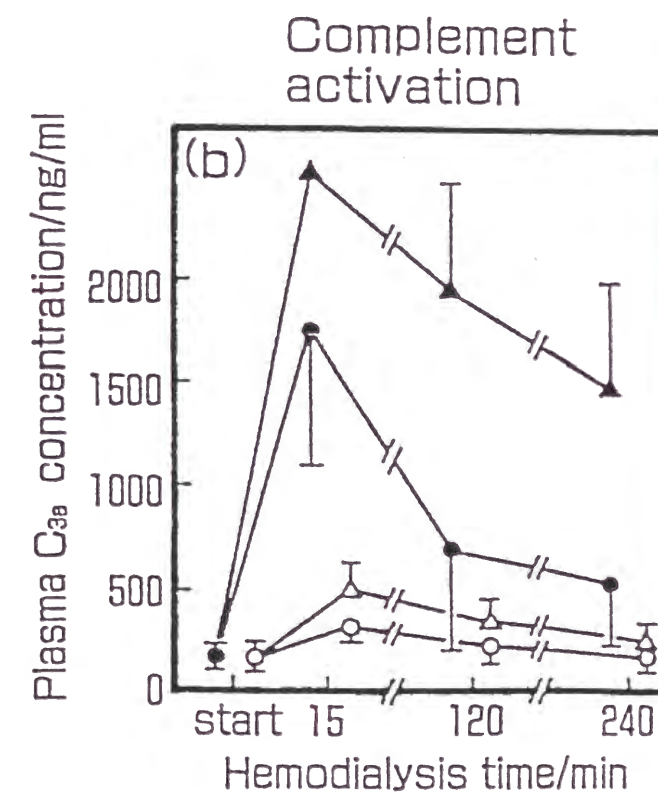
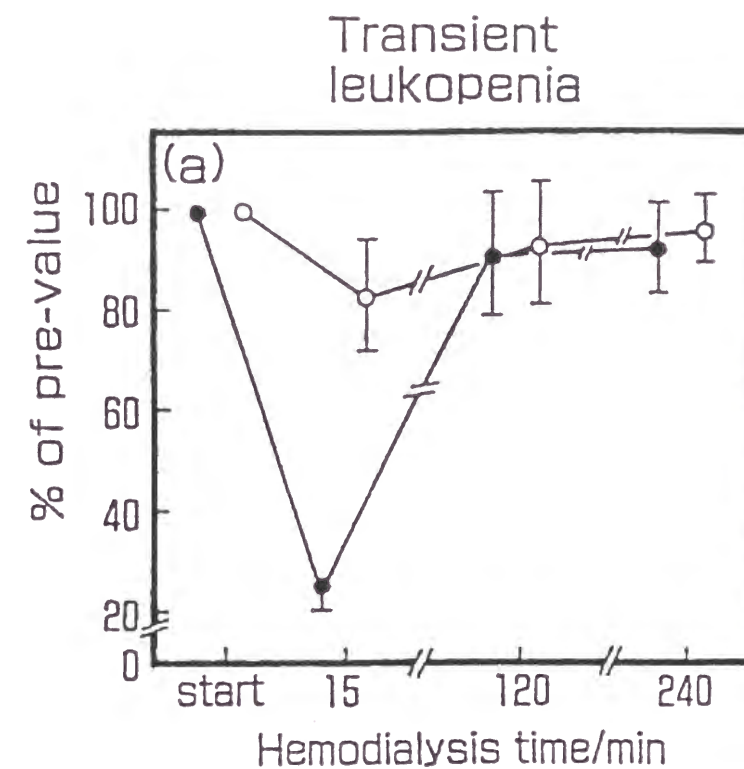


図3-2. 白血球数の経時変化(a), 及び補体C3aの経時変化(b)

(a) ○, PEG鎖グラフトセルロース膜; ●, セルロース膜

(b) ○, 動脈側; △, 静脈側, ●, 動脈側; ▲, 静脈側

### 3-2-2. 透析性能の制御

再生セルロース膜は、銅アンモニアセルロース溶液を湿式紡糸することによって製膜される。多孔質構造は湿式凝固の過程で形成されるが、この多孔質構造が溶質の透過性能の制御において重要な役割をはたしている。また、その膜の多孔質構造を解析する技術が同時に重要であることは言うまでもない。膜の孔構造の形成をコントロールする技術および孔構造を解析する技術の両者を合わせて始めて目的にあった透過性能を有する膜の設計と製造が実現される。

膜の孔構造の制御技術の考え方を図3-3に示す。膜の孔構造の制御には凝固の速度と相分離平衡組成の両者の側面からの制御が必要である。すなわち、膜の多孔質構造は凝固により生じたポリマー粒子が成長して連なり、多孔質構造のマトリックスが形成される<sup>6)</sup>。我々は、凝固速度は凝固液に用いる電解質の種類、温度、濃度を適切に選ぶことによって、ポリマー層と凝固液の界面に生じる界面電位により制御できることを新たに見出した<sup>7)</sup>。この電位の制御により粒子の成長速度、すなわち成長粒子の大きさを制御することが可能である。また、粒子の核の生成、パッキングの状態は相分離組成により決定される。この両者により膜の多孔質構造が形成され、さまざまな孔径の膜を作製することができ、結果的に溶質の透過性能をコントロールすることができる。

相分離過程における粒子の成長と膜構造の形成過程を図3-4に模式的に示す。まず始めに核が形成され、その核を中心として1次粒子が成長し、この1次粒子が集まって2次粒子が形成される。2次粒子が凝集することにより多孔質構造のマトリックスが形成されている。

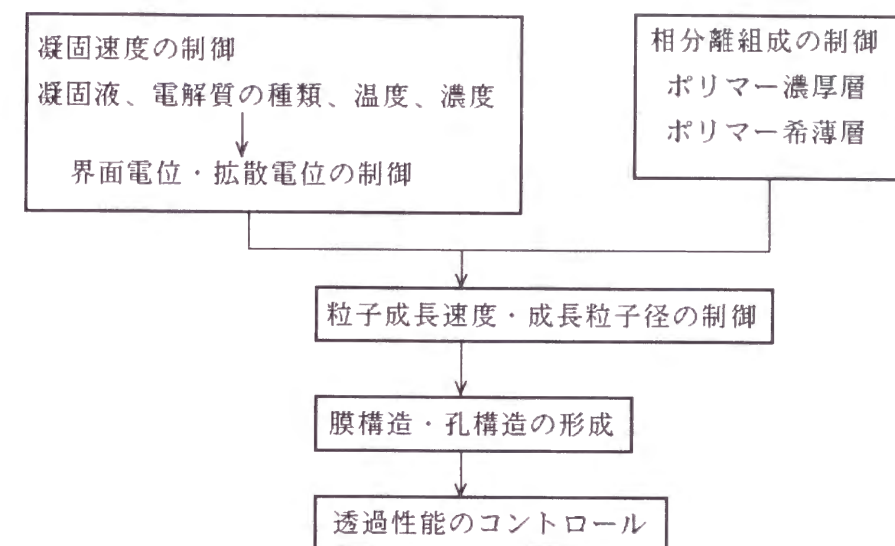


図3-3. 膜・孔構造制御の考え方

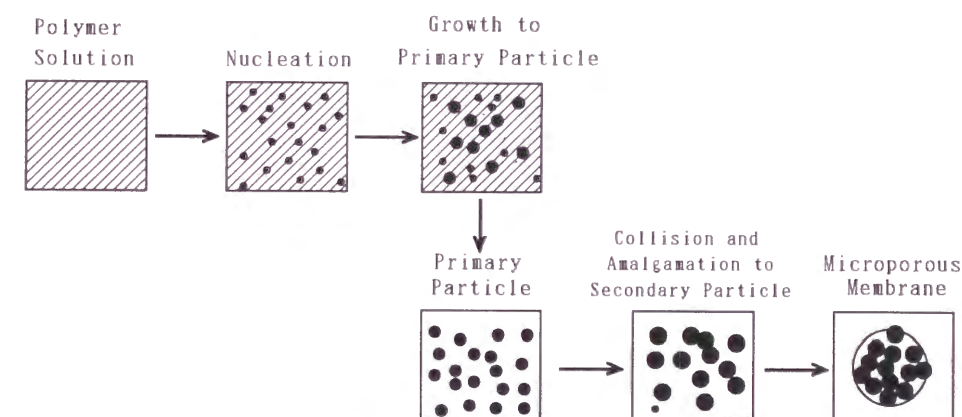


図3-4. 銅アンモニアセルロース溶液の相分離と膜構造形成過程

再生セルロース膜は銅とアンモニアを溶媒成分とした銅アンモニアセルロース溶液の湿式紡糸により製造される。図3-5は銅アンモニアセルロース溶液と凝固液が接触することにより発生する界面電位の発生メカニズムを表したものである。左側がセルロース溶液であり、この溶液の中にはセルロースの他に溶媒成分である銅、アンモニア、その他の物質が含まれている。右側は凝固液である電解質溶液を示しており、中央の線が両液の界面を表している。

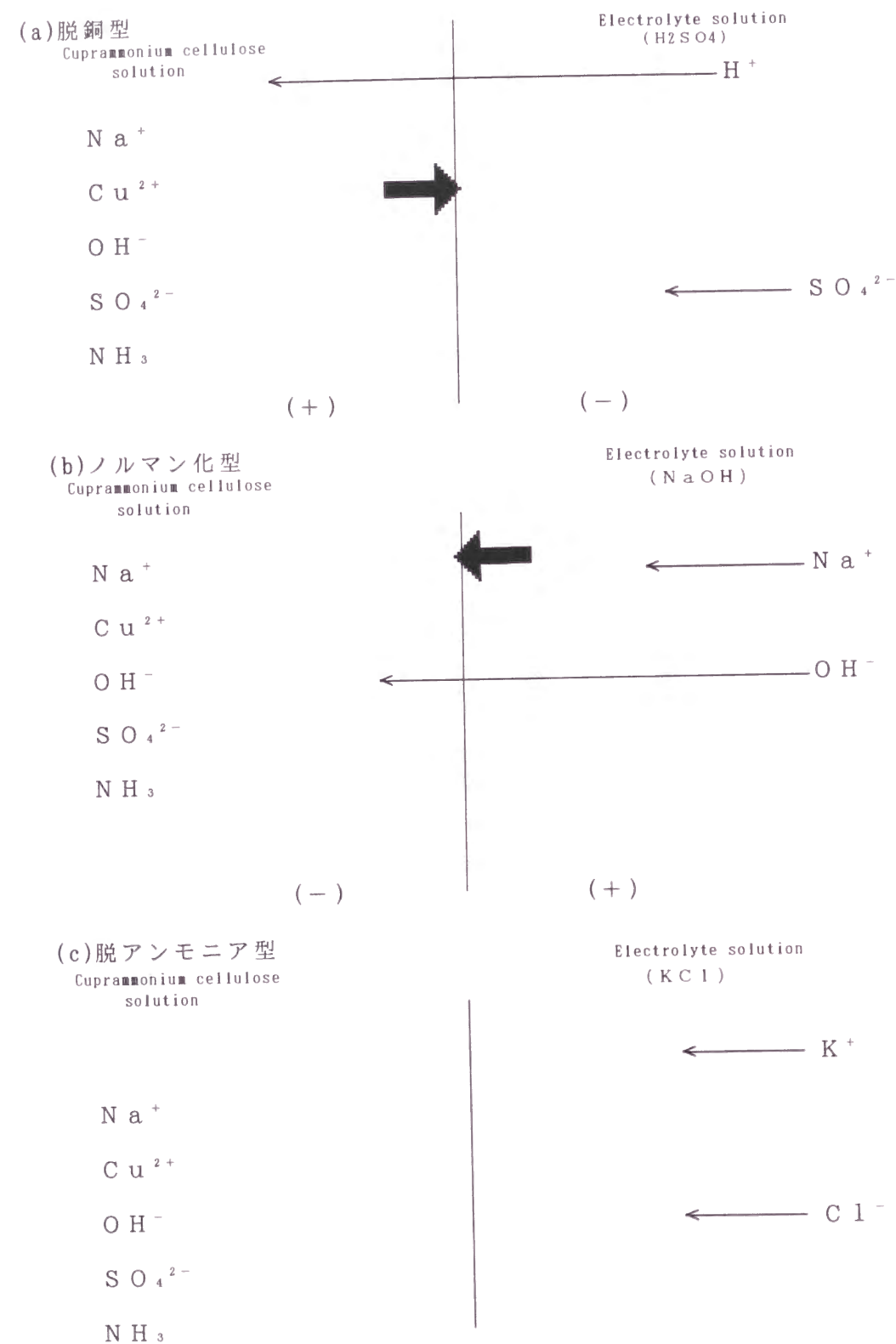


図3-5. 凝固における界面電位の発生と凝固メカニズムの分類

(a) に硫酸等の酸性溶液を凝固液に用いた場合の界面電位の発生を示す。セルロース溶液側がプラス、凝固液側がマイナスの界面電位が発生する。(b) は、凝固液に水酸化ナトリウムを用いた場合である。この場合にはセルロース溶液側がマイナス、凝固液側がプラスの界面電位が発生する。(c) は、凝固液に塩化カリウム等の中性塩水溶液を用いた場合である。この場合にはセルロース溶液と凝固液との界面に電位は発生しない。セルロースの凝固は界面電位により3つの凝固のタイプに分けられる。第1は凝固液側がマイナスになることによりセルロース溶液中の銅イオンの凝固液中への移動が促進され、凝固が進行する脱銅イオン型凝固。第2は、セルロース溶液側がマイナスになることにより、凝固液中のナトリウムイオンがセルロース溶液中に浸入してセルロースとナトリウムの錯体形成反応が起こり、凝固が進行するノルマン化型凝固、第3は、界面電位は発生せずセルロースの溶媒であるアンモニアが凝固液側に移動することによって凝固が進む脱アンモニア型凝固である。どの型の凝固過程で凝固が進行するかは凝固液の電解質の種類により決定される。すなわち、凝固液中のイオンと銅アンモニアセルロース溶液の界面に発生する界面電位がイオンの移動速度に影響し、凝固のメカニズムを決定していると考えられる。

界面電位に対する銅イオンのフラックスをプロットした結果を図3-6に示す。界面電位と銅のフラックスには相関が認められ、さらに、凝固のタイプを3つに分けることができる。すなわち、界面電位がマイナスの領域では、銅イオンのフラックスが大きい脱銅イオン型凝固、銅イオンのフラックスが小さく界面電位がプラスの領域では、ノルマン化型凝固、銅イオンのフラックスも界面電位も0付近である脱アンモニア型凝固の領域に分類することができる。



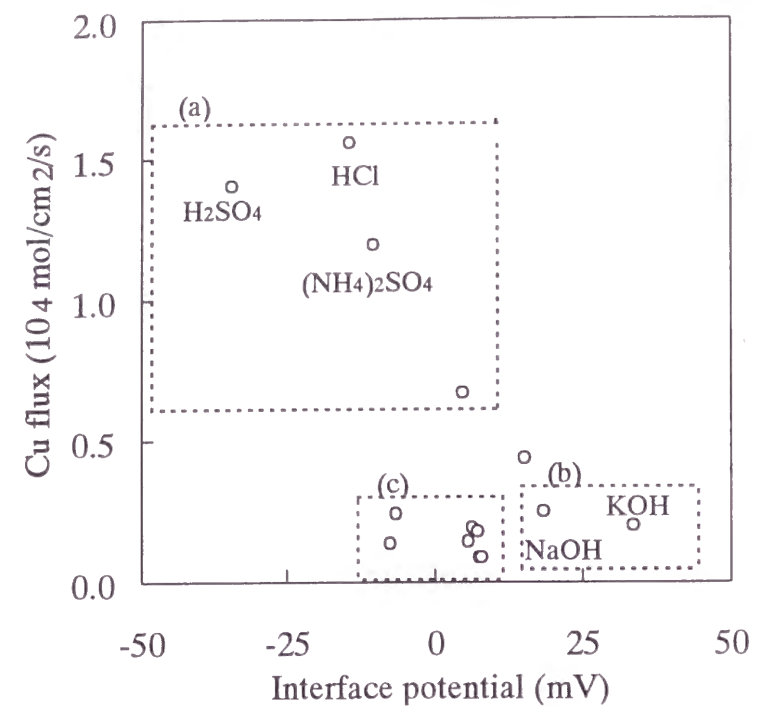
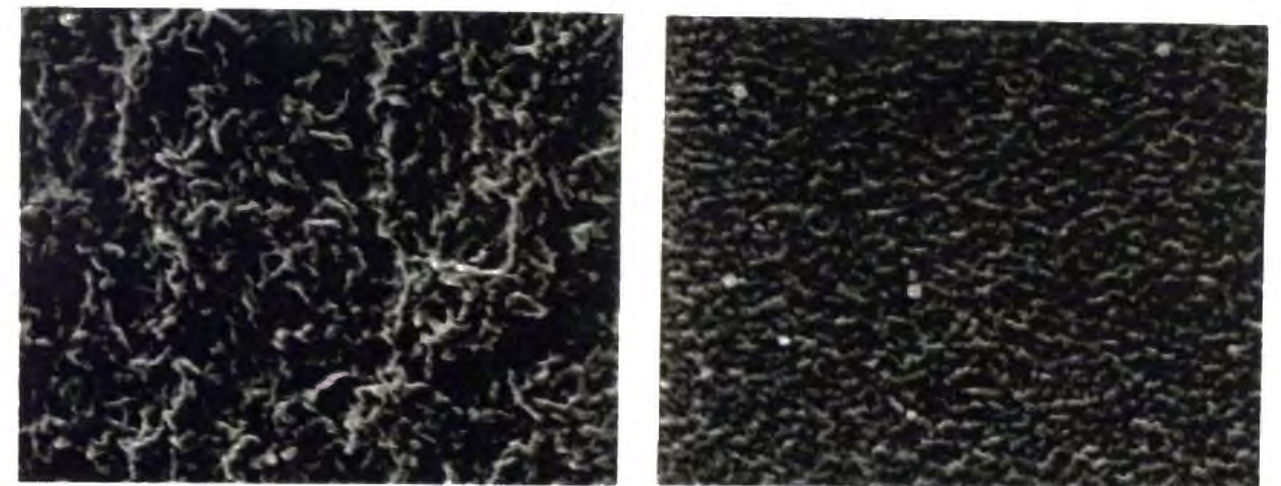


図 3-6 . 界面電位と凝固液への銅イオン流束 (25°C)  
 ( a ) 脱銅型凝固  
 ( b ) ノルマン化型凝固  
 ( c ) 脱アンモニア型凝固

超高分解能走査型電子顕微鏡 (日立 UHR-SEM S5000) により観察した中空糸膜の構造写真の例を図 3-7. に示す。凝固のタイプ (ノルマン化型凝固, 脱銅イオン型凝固) により構造が変化していることが観察される。すなわち、凝固液の種類により粒子の大きさは変化しており、異なった多孔質構造が形成されていることが解る。

このように、種々の電解質溶液を凝固液として使用することで、凝固液-セルロース溶液間の界面電位を変化させることができ、それによって銅を始めとした物質の移動速度を制御することがでる。さらに濃度、温度を変えることにより、粒子の成長速度、すなわち成長粒子径の制御が可能となり、孔径の制御が実現される。



500 nm  
 (a) 脱銅イオン型凝固 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

500 nm  
 ノルマン型凝固 (NaOH 凝固)

図 3-7 . セルロース中空糸膜表面の走査型電子顕微鏡観察

### 〔 3 － 3 〕 構造解析技術

血液透析膜の構造解析法には、孔径の測定法として、透水量やふるい係数、物質移動係数の測定値から細孔モデルに基づいて孔径を算出する方法（細孔理論法）<sup>8)</sup>、膜内の水の凝固点降下度が膜内での存在状態によって異なることを利用した D S C 法 が従来から報告されている。細孔理論法は膜構造モデルを仮定しなければならず任意性を免れない。D S C 法は素材と水の相互作用の強さ等の孔径以外のパラメータの影響が反映されてしまう。そこで我々は、血液透析用再生セルロース中空糸膜の構造解析手法として S E M による画像解析法および小角 X 線散乱法についての検討を試みた。

S E M による観察は定性的に孔の大きさを比較する事ができる。さらに我々はこの S E M 写真を定量的に評価するために旭化成工業（株）が開発した画像処理システム（高精細画像解析ファイルシステム IP-1000）を用いて定量的な解析を行った。図 3－8 に画像処理により測定した孔面積の分布を示す。横軸に孔面積、縦軸にその割合を示したものである。孔面積は図 3－8 に示されるような分布を持って検出されることが判る。

また、我々は現在小角 X 線錯乱法を用いた膜の構造解析法の可能性についても研究を進めている。小角 X 線錯乱法は数 n m から数  $\mu$  m といったいわゆる”コロイド”領域の大きさを持つ粒子が形成する電子密度のゆらぎによる X 線の錯乱強度分布から、その構造を捉える手法である。この測定法は、湿潤状態での構造の解析が可能であり、透析膜の使用状態が反映された構造解析手法である。また、現在血液透析膜の分野において、孔半径の測定によく用いられている細孔理論法とは異なり、モデルの仮定を必要としないのが大きな特徴である。さらに平均孔径だけでなく孔径分布の測定も可能である。孔径の測定では小さい孔の測定が一般的には難しいが、図 3－9 は従来から使用されているセルロース膜の中では小孔径の部類に属する透析膜（旭メディカル A M－S D 15 H）を解析した例である。バックグラウンドの補正の仕方等に問題が残されているが、図 3－9 に示されるような孔径分布曲線を得ることができる。



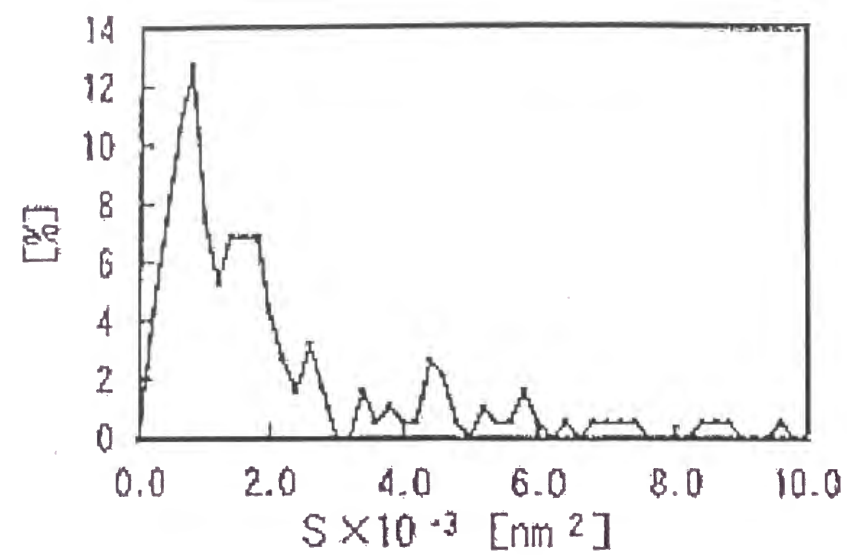
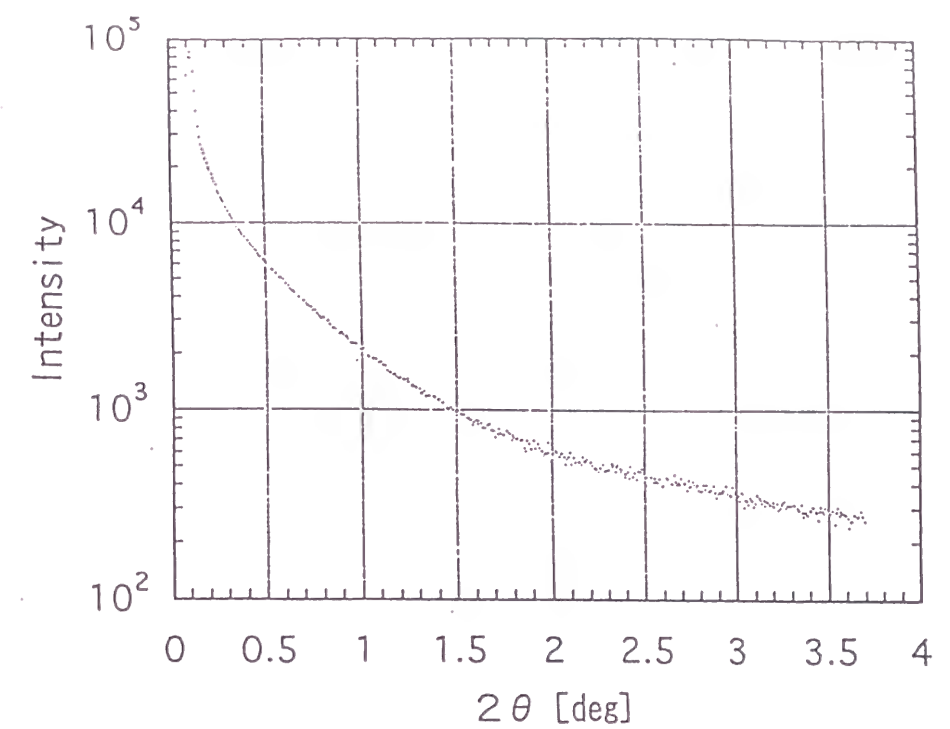
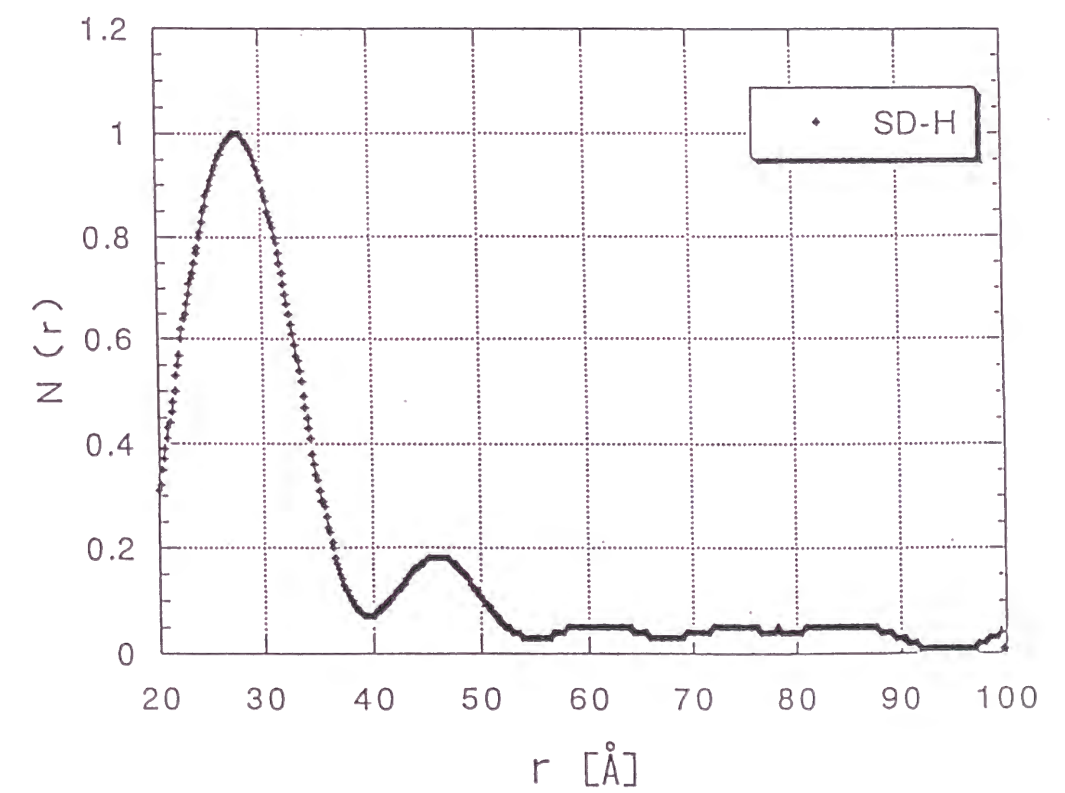


図3-8. 電子顕微鏡観察写真の画像解析法による孔径分布測定



小角X線散乱曲線



孔径分布曲線

図3-9. 小角X線散乱法による孔構造の測定  
(サンプル: AM-SD-H)

### [ 3 - 4 ] まとめ

再生セルロース膜は孔径の制御、特に大孔径化が難しいと従来から認識されていたが、以上のような膜の孔構造形成技術および構造解析技術を基礎技術として、図 3 - 10. の分画曲線に示されるような溶質透過性能を有する再生セルロース膜の製造或いは開発を進めてきた。図 3 - 10に示されるように再生セルロース膜においても幅広い溶質分子量範囲で透過性能を制御することが可能である。

①セルロース膜の表面にポリエチレングリコール ( P E G ) 鎖をグラフトすることにより優れた生体適合性が付与される。

②銅アンモニアセルロース溶液の凝固には、界面電位が重要な役割を果たし、界面電位と銅イオンのクラックスにより、凝固のメカニズムは脱銅イオン型凝固、ノルマン化型凝固、脱アンモニア型凝固の 3 つのタイプに分類される。

③セルロース膜では、凝固速度や凝固メカニズムをコントロールする事により、広い範囲で溶質透過性を制御した膜を作製することが可能である。

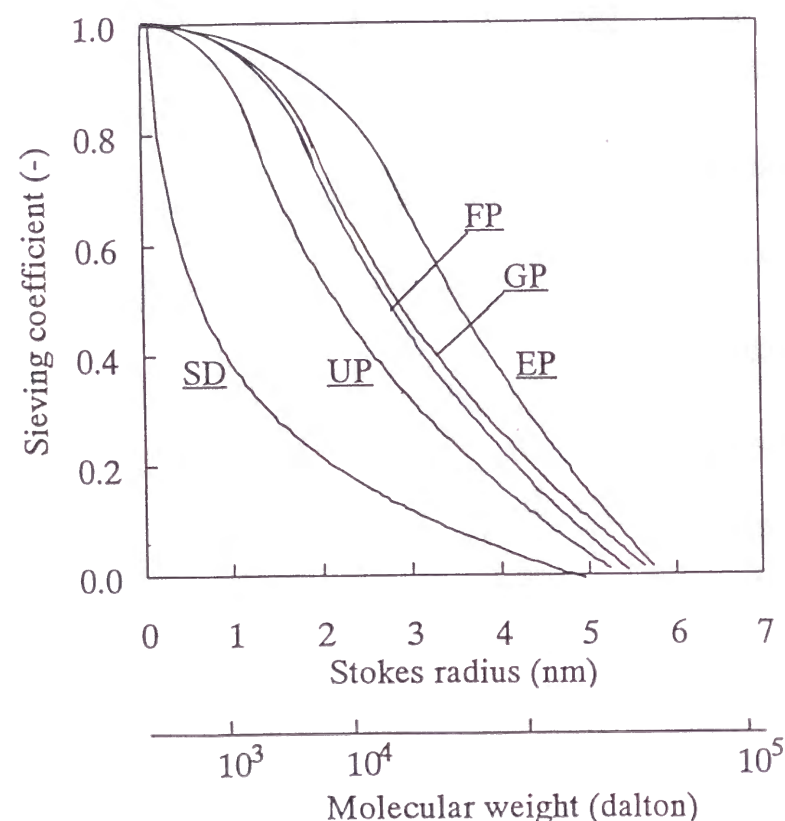


図 3 - 10. 再生セルロース中空糸膜の篩係数と溶質分子量依存性

### 参考文献

- 1) Gejyo F, Yamada T, Odani S, et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 701, (1985)
- 2) 岸田晶夫, 筏 義人: 人工臓器 17, 47, (1988)
- 3) 木野恭子, 前田憲秀, 衣笠えり子, 秋沢忠男, 他: 人工臓器 18, 1170, (1989)
- 4) 松井則秋, 中村義弘, 安藤亮一, 栗山兼二郎, 他: 人工臓器 22, 70, (1993)
- 5) 福井博義, 早野恵子, 三浦 洋, 金子由美, 他: 透析会誌 26, 1267, (1993)
- 6) Kamide K, Manabe S: in Materials Science of Synthetic Membranes. Am. Chem. Soc, p. 197 (1985)
- 7) 伏見文良, 渡邊哲夫, 日吉辰夫: Polymer Preprints Japan, 43, 1087, (1994)
- 8) 竹沢真吾, 小沢喜久夫, 三村理七, 酒井清孝: 人工臓器 13, 1460, (1984)
- 9) 石切山一彦, 十時 稔, 他: Polymer Preprints Japan, 35, 7, 2090, (1986)

## 第4章 銅アンモニアセルロース溶液の凝固における界面電位の役割

### 〔4-1〕緒言

1857年に Schweizer によって見出された銅アンモニアセルロース溶液 (CCS) は<sup>(1)</sup>、再生セルロース産業の代表であるベンベルグレーヨン工業を一世紀以上に亘って支えてきている。この CCS をベースとした継続的な繊維技術開発は人造繊維におけるベンベルグレーヨンのポジションを維持してきたと同時に、新たなフィールドへの用途展開をもたらしてきた。血液浄化<sup>(2)</sup>やウィルスの除去<sup>(3)</sup>に用いる中空繊維、不織布、動物細胞培養担体に用いるマイクロポーラスマイクロキャリア<sup>(4)</sup>等がそれである。

再生セルロース繊維は、工業的には硫酸凝固、或いは熱水凝固、ノルマン化凝固<sup>(5)</sup>による湿式紡糸によって生産されている。衣料繊維の生産は銅とアンモニアを溶解する硫酸による凝固が一般的に採用されている。血液浄化用の中空繊維は、ノルマン化反応によるセルロースと Na<sup>+</sup> イオンのコンプレックス形成を伴う NaOH 凝固法により生産されている<sup>(6)</sup>。ノルマン化反応は CCS の凝固メカニズムとして1世紀も前に提唱されたものであるが、系統的な研究は今日まで行われてこなかった。しかし、中空糸膜の構造や特性の精密な制御の観点からは、更に深い理解が必要になっている。再生セルロース中空糸は、血液透析治療に広く用いられている。透過性能、特に分子量 5,000 から 66,000 の範囲の溶質分子の高い透過性能の改良が、現在の血液透析膜に於ける最大の開発焦点になっている。この目的の実現の為には、CCS 凝固メカニズムのより詳細な理解が不可欠である。

CCS 凝固の挙動は凝固液中の電解質イオンにより大きく異なる。このことが凝固メカニズムの解明を難しくしている。従来 CCS の凝固は、凝固液への銅イオン及びアンモニアの脱離と、複合体の形成<sup>(7)</sup>だけで考えられてきたが、これだけでは凝固メカニズムの理解には不十分であると言はざるを得ない。

CCS、凝固液両者共に電解質溶液である。従って両者の界面におけるイオン濃度差と拡散移動によって、界面ポテンシャルが発生しており、このことが凝固の挙動に大きく影響することは容易に類推されることである。

本研究では、CCS と凝固液に用いる種々の電解質水溶液間の界面に発生する界面電位、及び銅、アンモニアの移動量を測定し、これらと凝固速度の関係を調べている。

### 〔4-2〕実験方法

#### 4-2-1. 銅アンモニアセルロース溶液の調整

CCS は Gibson ら<sup>(8)</sup>の方法により溶解調整した。溶解調整後 4℃以下に保存し、30分以内に各測定を行った。溶解液の組成は、アルカリ度はアンモニアを蒸散除去させた後に中和滴定で求め、他の成分組成は仕込量から求めた。溶解液の粘度は標準粘度計 (Mettler Rheomat 115) により測定した。

#### 4-2-2. 凝固液と凝固速度

凝固液は表 4-2. に示す種類の特級グレード試薬を濃度 1.0eq/l で蒸留水に溶解させたものを用いた。

それぞれの凝固液での凝固速度は、濃度 1.0eq/l, 25℃の凝固液電解質水溶液に CCS を浸漬し、触感テストで「strong」(浸漬後 1 秒以内に凝固。 )、「moderate」(浸漬後 1～30 秒以内に凝固。 )、「weak or nil」(浸漬後 30 秒では凝固しない。 ) の3レベルに分類した。又、それぞれのテストは 10 回以上行い、再現性を検定した。



#### 4-2-3. 銅／アンモニア、フラックスの測定

0.1ml の CCS を試験管チューブに入れ、1ml の凝固電解質水溶液を両液の接触界面面積が  $0.2\text{cm}^2$  になるように加えた。10 秒後に電解質水溶液を取り出し、原子吸光 (島津 AA-670) 分析により銅の量を、ケルダール分析 (三菱化学 KN-01) によりアンモニアの量を分析した。実験の全ての操作は  $25^\circ\text{C}$  にて行われている。

#### 4-2-4. 界面電位の測定

CCS と凝固電解質水溶液との界面電位は図 4-1 に示す装置を用いて測定した。Fig-1 において左側の容器には 1.0eq/l の KCL 水溶液、右側には 1.0eq/l の凝固電解質水溶液が入っている。クロロイオンを含まない凝固電解質水溶液の場合には、電解質溶液と銀 / 塩化銀電極間の界面電位を安定化させる為に KCL(0.05M) を添加した。

左右 2 つの容器は CCS 或いは KCL で飽和させたアガロースゲルを満たした U 字管でつながれている。電位差 ( $\Delta\phi$ ) は電位差計 (東亜電子, PM-18R) で測定した。

#### [4-3] 結 果

CCS の組成を表 4-1 に示す。カチオン種濃度がアニオン種濃度を上回っているが、溶液全体の電気的中性はセルロース水酸基の解離によって成立しているものと考えられる。溶液の粘度 ( $25^\circ\text{C}$ ) は  $100\text{Pa}\cdot\text{S}$  であり、凝固電解質水溶液との物質収支や界面ポテンシャル測定に適う界面を維持し得る粘度である。

表 4-2 に示すように、NaOH, KOH,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  各水溶液での凝固速度は極めて早く 1 秒以下であった。  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  各水溶液での凝固速度は 1 ~ 30 秒、その他の電解質水溶液の場合は 30 秒以上であった。表 4-2 に示されるように、界面に於けるアンモニアの移動量は電解質により多少の変動はあるが、概ね  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/cm}^2/\text{s}$  であった。一方、銅の移動量は電解質溶液の種類に大きく依存しており、HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の順であった。

測定された界面電位の結果を表 4-2 に示す。結果は測定されたセル間電位差

から次の構成により算出されたものである。

System 1: Ag/AgCl/ I / II / III /AgCl/Ag

System 2: Ag/AgCl/ I / II ' / III /AgCl/Ag

ここで I は 1.0M KCl, II は CCS, II ' は飽和 KCl アガロースゲル, そして III は 1.0eq/l 電解質溶液である。左右の Ag/AgCl 電位をそれぞれ、 $\phi_L$ ,  $\phi_R$  とすると、System 1 におけるセル間電位は、

$$\Delta\phi_1 = \phi_{R,1} - \phi_{L,1}$$

$$= (\phi_{R,1} - \phi_{III,1}) + (\phi_{III,1} - \phi_{II,1}) + (\phi_{II,1} - \phi_{I,1}) + (\phi_{I,1} - \phi_{L,1})$$

System 2 では

$$\Delta\phi_2 = \phi_{R,2} - \phi_{L,2}$$

$$= (\phi_{R,2} - \phi_{III,2}) + (\phi_{III,2} - \phi_{II',2}) + (\phi_{II',2} - \phi_{I,2}) + (\phi_{I,2} - \phi_{L,2})$$

電位差 ( $\phi_{R,1} - \phi_{III,1}$ ) と ( $\phi_{R,2} - \phi_{III,2}$ ) は ( $\phi_{I,1} - \phi_{L,1}$ ), ( $\phi_{I,2} - \phi_{L,2}$ ) と同じようにほぼ等しい。更に ( $\phi_{III,2} - \phi_{II'}$ ) と ( $\phi_{II'} - \phi_{I,2}$ ) の値はこれら 2 つの界面を通してのイオン輸送は KCl によって支配されるためゼロに近似する事が出来る。よって、2 つのセル間電位差は次のように表される。

$$\Delta\phi_1 - \Delta\phi_2 = (\phi_{III,1} - \phi_{II,1}) + (\phi_{II,1} - \phi_{I,1})$$

#### [4-4] 考 察

表 4-2 に集約されるように、測定された結果から CCS の凝固メカニズムは次の 3 つのタイプに分類することが出来る。

- ・脱銅タイプ：脱銅速度、凝固速度が速く、凝固は CCS からの脱銅速度により支配されている。  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- ・ノルマン化反応タイプ：脱銅速度は遅いが、凝固速度は速い。凝固はノルマン化反応によるコンプレックス形成により進行。 KOH, NaOH
- ・脱アンモニアタイプ：脱銅速度、凝固速度は共に緩慢であり、凝固は CCS からの脱アンモニアにより進行。その他の電解質。

強アルカリ性 CCS 中において、銅は 2 価カチオンで存在しているが、アンモニア ( $\text{pK}_a=9.25$ ) はイオン化はしていない。本研究の結果では図 4-2 に示されるよ

うに、銅の移動量は電解質水溶液の種類に明らかに依存するが、アンモニアは依存していない。従って、界面に於けるイオン移動は濃度勾配だけではなく界面ポテンシャルにも依存していることが伺われる。

#### <界面電位と銅の移動量>

CCS から濃度 1.0eq/l の電解質水溶液への銅移動量と界面電位 (  $\phi_{III} - \phi_{II}$  ) を測定した全ての電解質水溶液種についての結果を図 4 - 3 に図示する。負の界面電位は CCS の電位に対して電解質溶液の電位が低い事を表しており、CCS から電解質溶液側への銅イオンの移動を促すことになる。逆に、正の界面電位は電解質側の電位が高い場合であり、銅イオンの移動は妨げられる事になる。即ち、図 4 - 3 の相関から、銅イオンの移動速度は主に界面電位により支配されていることが解る。図 4 - 3 の界面電位と銅移動速度の関係、そして凝固速度、及び界面におけるナトリウムイオンの移動を考慮すれば、これらの系に於ける凝固メカニズムは次のグループに区分することが出来る。

(a) 脱銅グループ：CCS から電解質溶液側への負の電位差により銅イオ移動が加速される系。(b) ノルマン化反応グループ：正の電位差により CCS から電解質側への銅イオンの移動は進まないが、電解質側から CCS への  $Na^+, K^+$  の移動が促されセルロースとの複合体形成により凝固が進行する系。(C) 脱アンモニアグループ：界面電位差の発生は無く、イオン移動による凝固は進行しない。アンモニアの離脱により凝固する系。

#### <界面電位発生のメカニズム>

CCS と電解質水溶液界面に発生する界面電位差は、拡散電位差を表す Henderson の式<sup>(9)</sup>によって説明される。一般的に、組成の異なる 2 つの電解質溶液が接した場合、濃度勾配によって溶質イオンは界面を移動する。イオン種はそれぞれ固有の易動度を示す為、易動度の高いイオンは他のイオンよりも速く移動するが、この移動速度の差に伴って電位差が発生することになる。接触する  $\alpha, \beta$  2 つの電解質溶液の界面に発生する拡散電位は次の Henderson の式によって表される。

$$\Delta \phi = \phi_{\beta} - \phi_{\alpha}$$

$$= \frac{RT}{F} \frac{\sum Z_i \omega_i [C_i(\beta) - C_i(\alpha)]}{\sum Z_i^2 \omega_i [C_i(\beta) - C_i(\alpha)]} \ln \frac{\sum Z_i^2 \omega_i C_i(\alpha)}{\sum Z_i^2 \omega_i C_i(\beta)}$$

ここで、 $\omega_i$  はイオン種  $i$  のモル移動度、 $z_i$  は電荷、 $C_i$  は濃度である。

Henderson 式によって計算される CCS とそれぞれの電解質水溶液間の拡散電位と、実際に測定された界面電位 (  $\phi_{III} - \phi_{II}$  ) の値を表 4 - 2 に示す。

測定した値と計算された拡散電位は図 4 - 4 に示すように良い相関を示しており、界面ポテンシャルは明らかに拡散電位として計算される Henderson 式で説明出来ることが解る。

#### <銅アンモニア溶液の凝固メカニズム>

CCS の凝固挙動を支配している界面ポテンシャルの凝固に於ける基本的な役割とは、電場下での各イオン種の動きから、凝固挙動の理論的予測を可能にすることである。

Strathmann らは相分離プロセスにおける全ての物質移動を化学ポテンシャルの勾配によって説明している<sup>(11)</sup>。しかし、Strathmann らの系は、polymer/solvent/nonsolvent の電荷を含まない系であり、イオン種よりなる CCS/電解質水溶液の系では電場ポテンシャル下での取り扱いが重要である。本研究で取り扱った界面ポテンシャルのような電場ポテンシャル下では、イオン種の移動は一般に次の Nernst-Planck の式によって表すことが出来る。

$$J_i = -\omega_i RT(dC_i/dx) - Z_i F \omega_i C_i(d\phi/dx)$$

ここで  $J_i$  はイオン種  $i$  のフラックスである。この式で示されるように、CCS/電解質水溶液系におけるイオンの移動は右辺第一項で表される濃度勾配だけではなく、第二項の電位勾配の関数でもある。

従って、CCS/電解質水溶液系の凝固挙動の理解と制御には、界面ポテンシャル、電荷、各イオン種の相対的な易動度が重要な要素となる。図 4 - 5 は、3 つの凝固メカニズムについて、それぞれの初期状態を模式的に表したものである。図中の矢の長さはそれぞれのイオン種の易動度に相当している。



タイプ (a) は、硫酸水溶液を電解質とした場合であり、脱銅による凝固のメカニズムを表している。CCS と電解質水溶液の接触界面においては、電解質水溶液側から CCS 側への  $H^+$  イオンの移動が、 $SO_4^{2-}$  イオンの移動を大きく上回っている。これら 2 種のイオン種の易動度の差が界面電位差を生成することになる。

CCS から電解質水溶液方向に負の電位勾配が形成されるため、CCS から電解質水溶液への  $Cu^{2+}$  イオンの移動が促進され、脱銅による凝固が進行することになる。

タイプ (b) は、 $NaOH$  水溶液を凝固液とした場合のノルマン化反応型の凝固メカニズムを表している。易動度の大きい  $OH^-$  イオンは  $Na^+$  イオンよりも速く電解質溶液側から CCS 側に移動する。その結果、電解質溶液側に形成された正の電位勾配が、 $Na^+$  イオンの CCS 側への移動を加速し、ノルマン化反応によるセルロースとの複合体形成を促すことになる。(C) は脱アンモニアによる凝固メカニズムを表している。 $K^+$  と  $Cl^-$  の易動度は、ほぼ等しい為、CCS と電解質水溶液界面には電位勾配は形成されない。CCS 成分の中では最も大きな拡散係数を持つアンモニアが電解質溶液側に拡散し、CCS の脱アンモニアが進むことにより凝固が進行する。

銅アンモニアセルロース溶液の凝固メカニズムは、3 つのタイプに分類する事によって理解されることを示した。この取り扱い CCS 以外にも電解質を含む種々のポリマー溶液の凝固挙動や特性の説明に適用できるものであろうと考えられる。

現在我々は、CCS の凝固挙動と、得られた再生セルロース膜の孔構造との関係を掘む研究を進めている。研究は未だ完成した段階ではないが、ノルマン化反応を伴う凝固により得られる膜は比較的緻密で均一な孔構造のものが得られるが、脱銅、或いは脱アンモニアによる凝固の場合は、凝固液に接する面に緻密なスキン層を持ち、他面に向かって孔径が大きくなるグラジエント孔構造の膜が得られることが確認されている。

表 4 - 1 . 銅アンモニアセルロース溶液 (CCS) の組成  
(セルロース濃度, 8.0wt%)

Species	Concentration (M)
$NH_3$	3.79
$Na^+$	0.382
$Cu^{2+}$	0.460
$SO_4^{2-}$	0.127
$OH^-$	0.078

表 4 - 2 . 界面電位, 銅及びアンモニア流束, 凝固速度と凝固メカニズム  
の分類 (25℃, 電解質溶液濃度: 1.0Eq/L)

Electrolyte	Potential (mV)		Flux (mol/cm <sup>2</sup> /s × 10 <sup>4</sup> )		Coagulation	
	Diff. <sup>a</sup>	Interf. <sup>b</sup>	Copper	Ammonia	Speed <sup>c</sup>	Type <sup>d</sup>
NaCl	10.2	7.6	0.084	0.86	S	A/R
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.4	-7.4	0.134	0.89	S	A/R
NaOH	21.7	18.6	0.244	1.22	F	N/R
KCl	5.6	5.8	0.137	0.96	S	A/R
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	-6.4	0.236	0.84	M	C/R
KOH	18.4	33.6	0.197	1.44	F	N/R
NH <sub>4</sub> Cl	5.6	4.9	0.667	— <sup>e</sup>	M	C/R
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	-10.4	1.196	— <sup>e</sup>	F	C/R
CaCl <sub>2</sub>	6.9	15.4	0.433	1.55	M	C/R
HCl	-22.0	-14.4	1.558	1.05	F	C/R
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-19.5	-34.4	1.401	1.29	F	C/R
LiCl	12.5	8.0	0.081	0.96	S	A/R
CsCl	5.0	6.6	0.189	1.12	S	A/R
RbCl	4.9	7.4	0.172	1.02	S	A/R

<sup>a</sup> Diffusion potential (theoretical).

<sup>b</sup> Interfacial potential (experimental).

<sup>c</sup> F, 1 s or less; M, 1 ~ 30 s; S, over 30 s.

<sup>d</sup> A/R, ammonia removal; N/R, normal reaction; C/R, copper removal.

<sup>e</sup> Indeterminate.

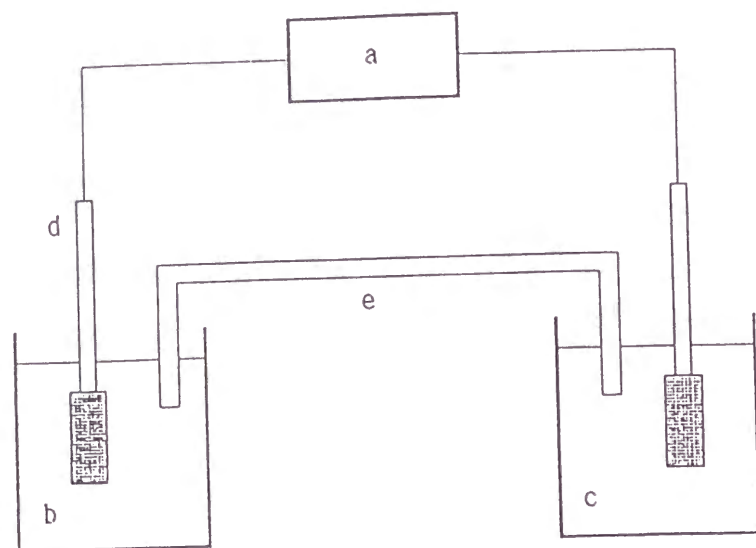


図4-1. 界面電位測定装置

(a, electrometer; b, 1.0M KCl; c, 1.0equiv/L electrolyte solution; d, Ag/AgCl electrodes; e, Ushaped glass tube loaded with CCS or agar gel containing saturated KCl.)

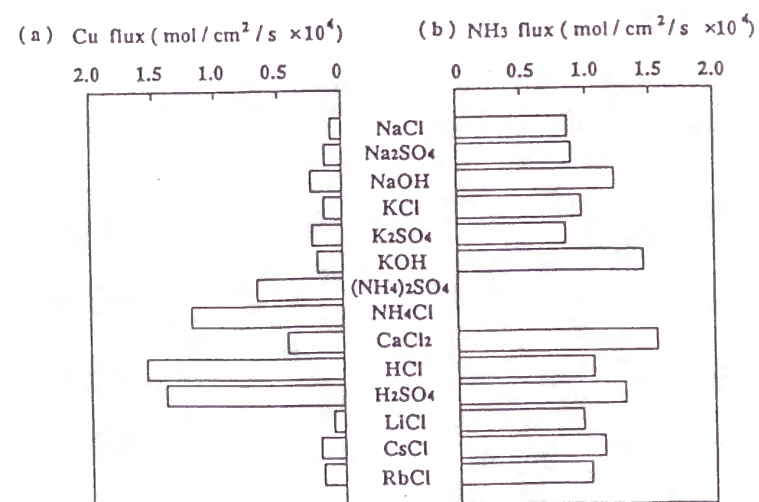


図4-2. CCSから各種電解質水溶液 (1.0equiv/L) への銅イオン, アンモニア流束 (25℃)

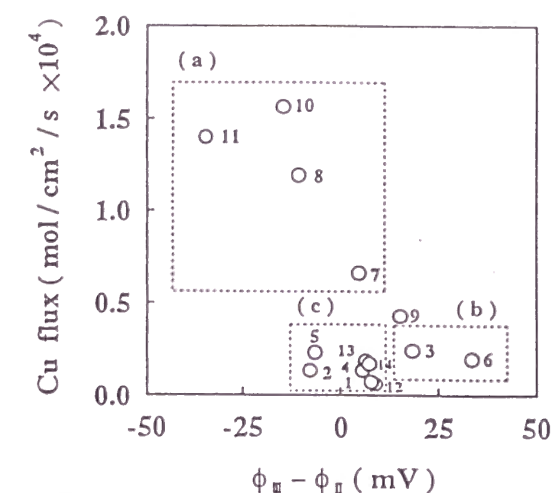


図4-3. 界面電位 ( $\phi_{III} - \phi_{II}$ ) と CCS から電解質水溶液 (1.0 equiv/L) への銅イオン流束。 (25℃)

(a) 脱銅イオン型, (b) ノルマン化型, (c) 脱アンモニア型。  
 (1, NaCl; 2, Na₂SO₄; 3, NaOH; 4, KCl; 5, K₂SO₄; 6, KOH; 7, NH₄Cl;  
 8, (NH₄)₂SO₄; 9, CaCl₂; 10, HCl; 11, H₂SO₄; 12, LiCl; 13, CsCl; 14, RbCl.)

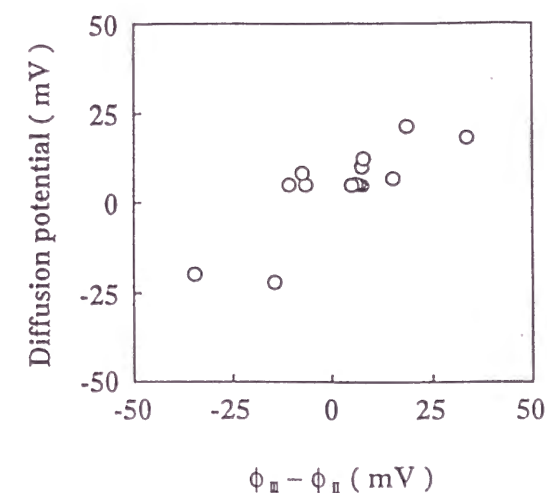
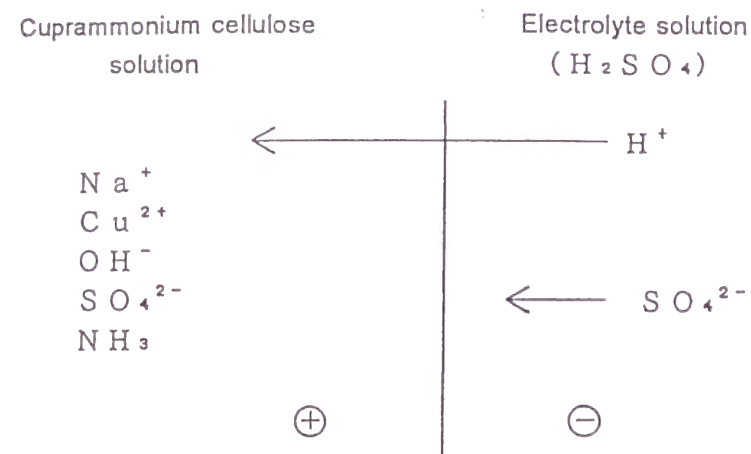
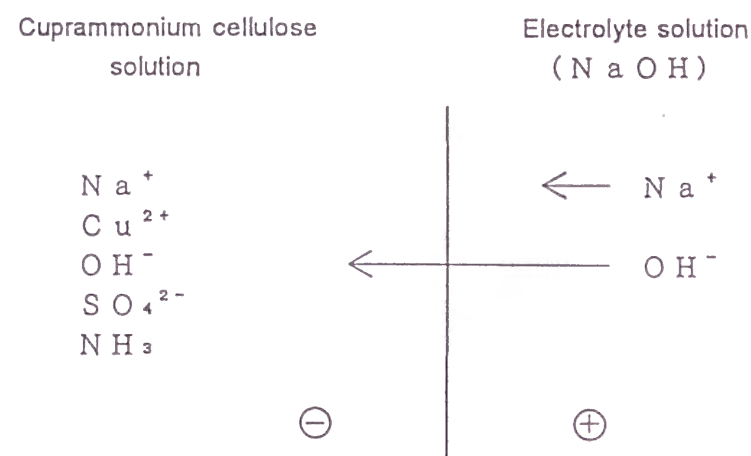


図4-4. 界面電位とHenderson式による拡散電位の相関。  
 (25℃, 電解質濃度 1.0equiv/L)

(a)



(b)



(c)

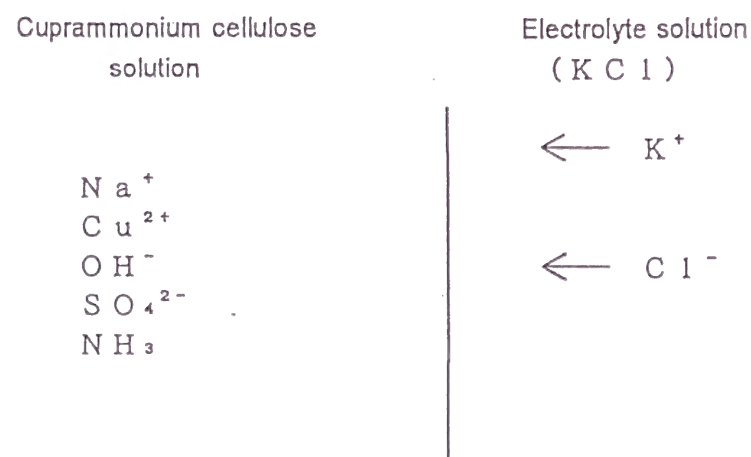


図4-5. 凝固における界面電位の発生と凝固メカニズムの分類。  
(図中、矢印の長さは各イオン種の相対易動度を表す。)

## 参考文献

- (1)E.Schweizer, J.Prakt. Chem., vol.72, 109, 344(1857)
- (2)M.Yokogi, Y.Sugimoto, and Y.Ono, U.S. Pat.4,535,028(1985)
- (3)T.Tsurumi, T.Sato, N.Osawa, H.Hitaka, T.Hirasaki, K.Yamaguchi, Y.Hamamoto, S.Manabe, T.Yamasita, and N.Yamamoto, Polymer J., vol.22,1085(1990)
- (4)J.Shirokaze, U.S.Pat.4,958,0147(1990)
- (5)H.C.Speel, Textile Chemicals and Auxiliaries,Reinhold, New york,1952,P.399
- (6)W.Normann,Chem.Ztg.,vol.30,584(1906)
- (7)E.Oka, E.Munakata, and M.Wadano, Kagaku Seni Rayon/Bemberg/Acetate, Maruzen, Tokyo, 1956, p.235
- (8)W.Gibson, L.Spencer, and R.McCall, J.Chem. Soc., vol.117, 479(1920)
- (9)A.J.Bard and L.R.Faulkner, Electrochemical Methods, John Wiley, New York, 1980, p.62
- (10)R.E.White, J.O'M.Bockris,B.E.Conway, and E.Yeager, Comprehensive Treatise of Electrochemistry vol.8, Experimental Methods in Electrochemistry, Plenum Press, New York, 1984, p.159
- (11)H.Strathmann, Materials Science of Synthetic Membranes, ACS Symposium Series 269, 1985, p.165
- (12)A.J.Bard, L.P.Faulkner, Electrochemical Methods, John Wiley, New York, 1980, p.27



## 第 5 章 再生セルロース膜の製膜技術と孔構造設計

### [ 5 - 1 ] 緒 言

日本国内の慢性透析患者数は15万人を超え、国内において使用されている透析器はすでに2,000万/本に達している。透析アミロイド症の原因物質とされる $\beta_2$ ミクログロブリンの効率的な除去と生体適合性を旨としたHPMの開発が競われてきたなかであって、再生セルロース中空糸膜は、低分子量蛋白質の除去能不足やロイコペニアの発生が指摘されてきたが、その安定した信頼性の高さから、現在においても依然として約50%の普及率を維持している。

本章においては、この再生セルロース膜の製膜技術、特に低分子量蛋白質領域の透過性制御を焦点とした製膜技術として膜の孔構造制御技術、さらにセルロース膜の生体適合性付与技術について研究した結果を述べる。

### [ 5 - 2 ] 再生セルロース中空糸膜の紡糸プロセスと構造制御の原理

再生セルロース中空糸膜の湿式紡糸プロセスの大略は図5-1に示されるように、紡口より吐出された銅アンモニアセルロース溶液を凝固させる凝固工程、次いで精錬再生を行う再生工程、そして乾燥工程と巻き取り工程に大別される。

中空糸膜の物質透過性を支配する膜の孔径と孔構造は、主に凝固工程において決定されている。銅アンモニアセルロース溶液の凝固の過程は、スピノダル分解機構による熱力学的相変化の過程であり、均一溶液のミクロ相分離を伴って進行する。スピノダル分解は、熱力学的に不安定な状態におかれたポリマー溶液が、ポリマー濃厚相と稀薄相に分離することによって、熱力学的安定状態を保つものである。このミクロ相分離の過程はセルロースポリマーの凝集核生成と成長によって進行する。

成長した凝集核は一次粒子を形成し、さらに一次粒子が融合して数百ナノメートルの二次～数次の粒子となり、成長した粒子が積層して図5-2に示すような膜構造マトリックスが形成される。膜の孔は粒子が充填されていない部分に形成

されることになる。したがって、セルロース中空糸膜の孔径と孔構造は、この相分離過程における粒子形成と積層の状態を制御することによってコントロールすることができる。今日では、この膜構造形成原理に基づいて、次に記するような種々の孔構造デザインが可能になっている。

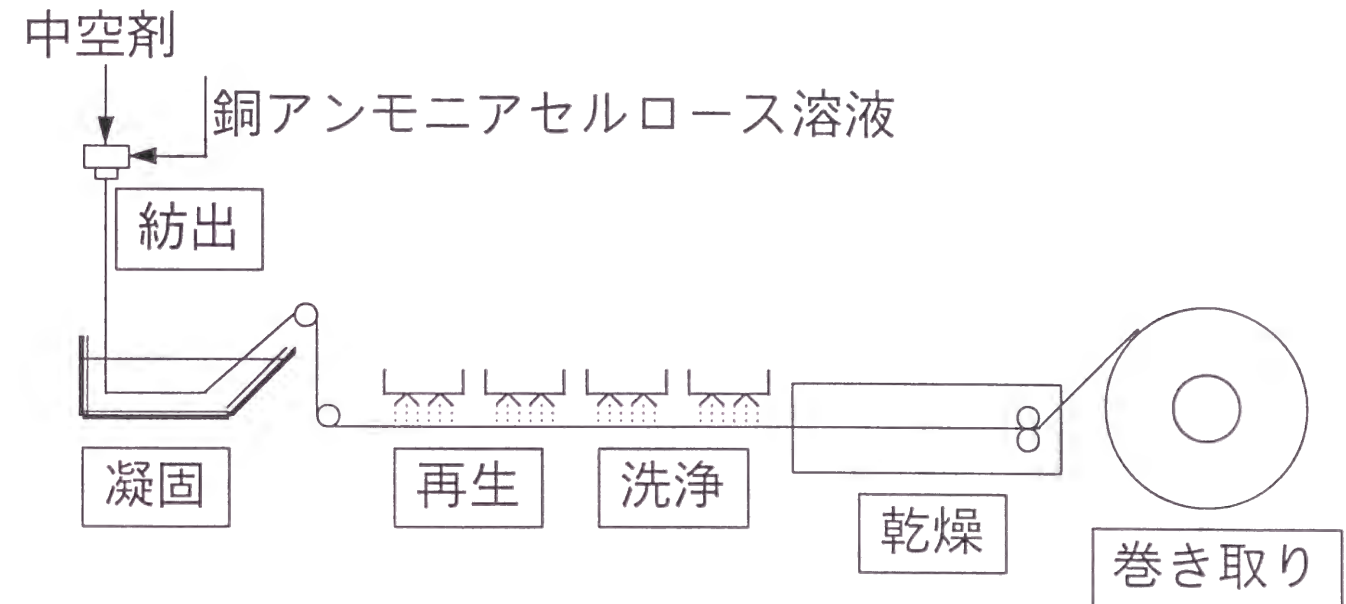


図 5 - 1 再生セルロース中空糸膜の製造プロセス

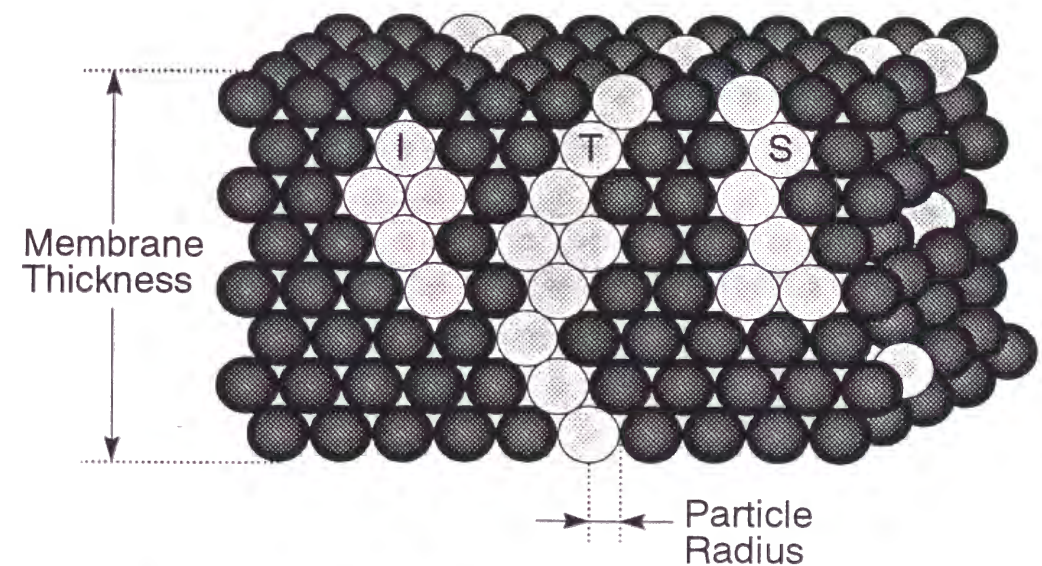


図 5 - 2 3次元積層構造モデルの模式図  
●, 2次粒子; ○, 空隙粒子; I, 独立孔; T, 貫通孔; S, 半貫通孔

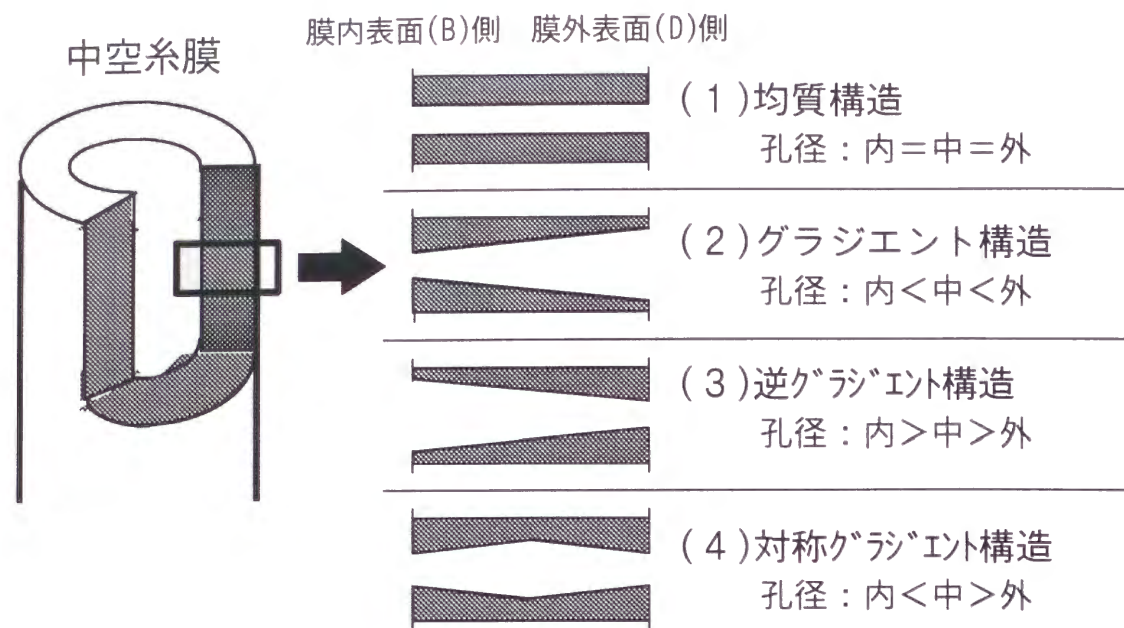


図5-3. 透析膜の孔構造模式図

### [ 5 - 3 ] 膜孔構造のバリエーション

中空系膜の膜厚方向における孔分布の概念を模式的に表すと、図5-3に示す4種類の分布様式が考えられる。すなわち、図5-3の(1)は膜厚方向の内壁面から外壁面にかけて均一な孔径を有する構造であり、再生セルロース膜を含めて従来最も一般的な孔構造である。図5-3の(2)は中空系内壁面から外壁面に向かって孔径が大きくなるグラジエント構造と呼ばれている構造であり、合成高分子系素材膜に多くみられる孔構造である。図5-3の(3)はその逆構造を形成するものであるが、この構造は血中成分の膜面での滞留や目詰まりが生じやすく、血液透析膜の構造としては好ましい構造ではないことは容易に推定される。図5-3の(4)は膜厚中央部の孔径を大きくした対称グラジエント構造ともいえる構造であり、従来の透析膜にはみられない新たな孔構造である。

この対称グラジエント構造は、図5-3の(1)の均一構造における透過抵抗の極小化に有効に作用するものと考えられる。膜厚中央部の孔径を大きくし、該

部の透過抵抗を極小化することによって膜厚全体の分画性を維持しつつ透過性を高めることができる構造である。すなわち、膜厚中央部は支持体層として機能し、実質的に膜厚みを薄くした場合と同様の効果を引き出すことができる。また、この対称グラジエント構造では、図5-3の(2)のグラジエント構造の弱点である中空系膜外側から内側への透析液の逆流をも極小化し得る効果が期待される。上記の湿式紡糸原理に基づいた製膜技術により、図5-3の(4)の対称グラジエント構造の孔径分布をもった新膜(P T-X膜)を試作した。

試作膜(P T-X)の膜厚方向断面切片を透過型電子顕微鏡観察を行い、得られた像の画像解析を行うことにより求められた膜厚方向の孔径分布の結果を図5-4に示す。図中、従来の製膜方法による再生セルロース膜(旭メディカル株、AM-GP)の孔径は膜厚方向に均一に分布しているが、図中の試作膜(P T-X)では内外表面部に比較して膜厚中央部の孔径が大きくなっていることがわかる。図5-5に示す方法により、イヌリン(分子量5,200)水溶液を用いて中空系内側から外側、および外側から内側への透過流束の異方性を測定した結果をあげる。

対称グラジエント構造のP T-X膜では中空系内側から外側への流束と、外側から内側への流束は均一孔構造と同様にほぼ同じ値を示しており、グラジエント構造にみられる中空系外側から内側への流束は制御されていることが確認できる。次に、透過性の指標として、P T-X膜の小分子量蛋白 $\beta$ 2ミクログロブリンの物質移動係数 $P_m$ と、従来のセルロース膜の $P_m$ を比較した結果を図5-6に示す。対称グラジエント構造のP T-X膜の $P_m$ は、従来の均一孔構造であるAM-GP膜に比較して、約2倍以上の値を示しており、対称グラジエント構造が透過抵抗の低減に有効に作用していることがうかがえる。

以上のように、対称グラジエント構造は血液透析膜において求められる理想的な孔構造を追求するなかから得られた構造であり、高い透過性と安全性、そして易操作性を同時に満足する構造であると考えられる。



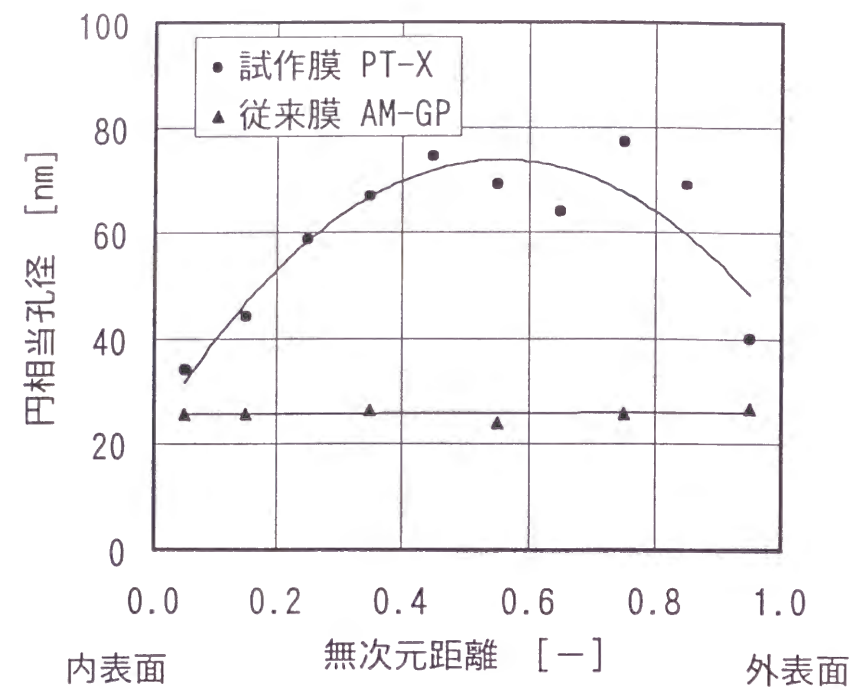
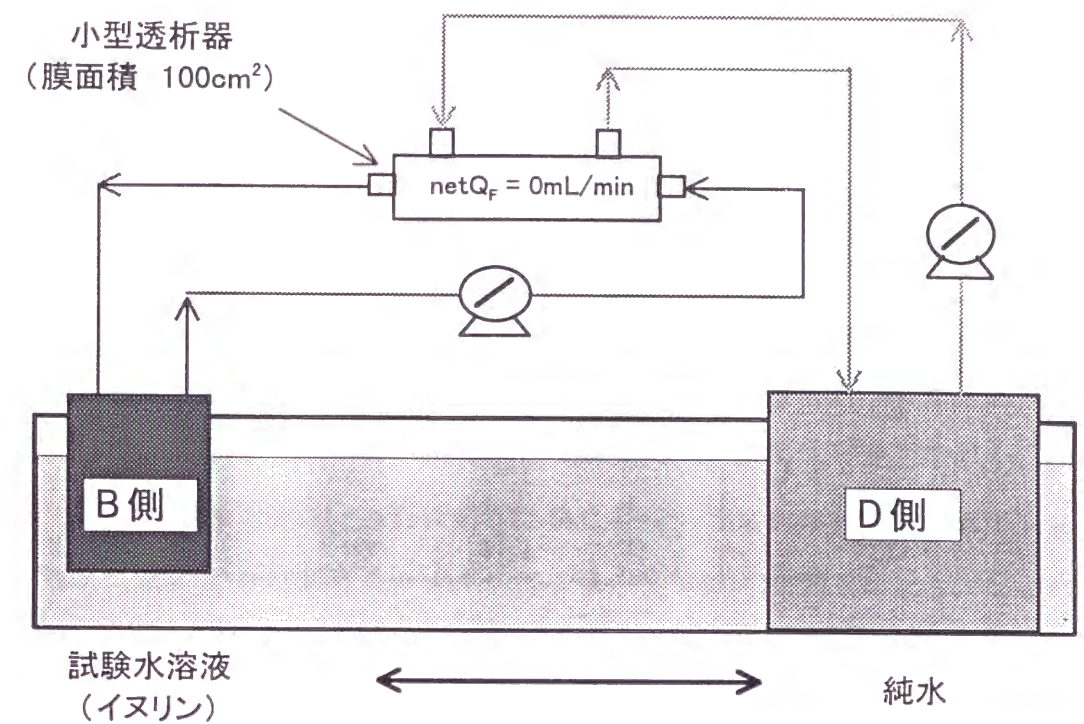


図 5 - 4 膜厚方向孔径分布の比較



孔構造	孔径分布の模式図 B側 ←→ D側	物質透過流束		
		Js1(B→D)	Js2(D→B)	Js2/Js1
均質		2.4	2.0	0.83
グラジエント		3.6	6.8	1.09
対称 グラジエント (PT-X)		3.2	3.3	1.03

図 5 - 5 膜厚方向孔径分布と物質透過の異方性  
(イヌリン、MW : 5,200)

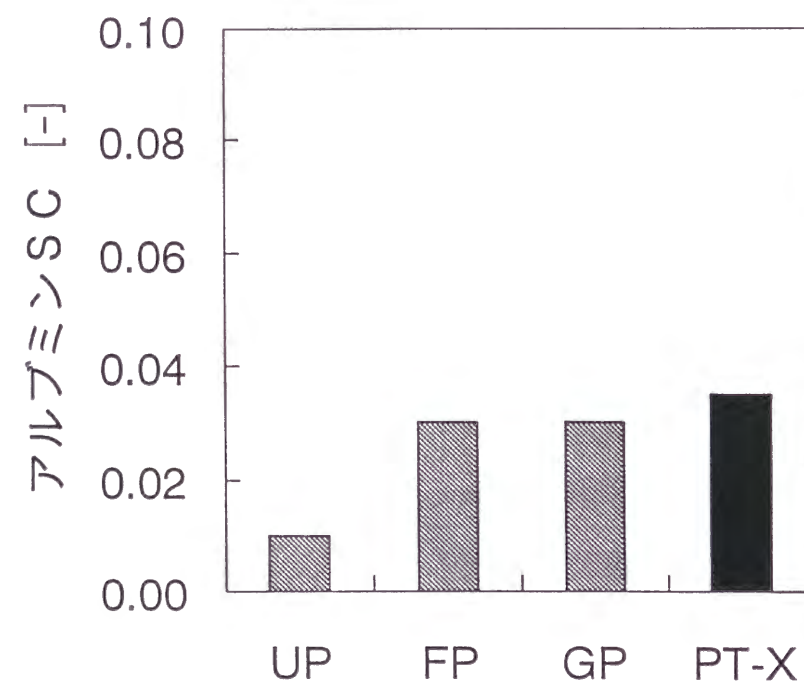
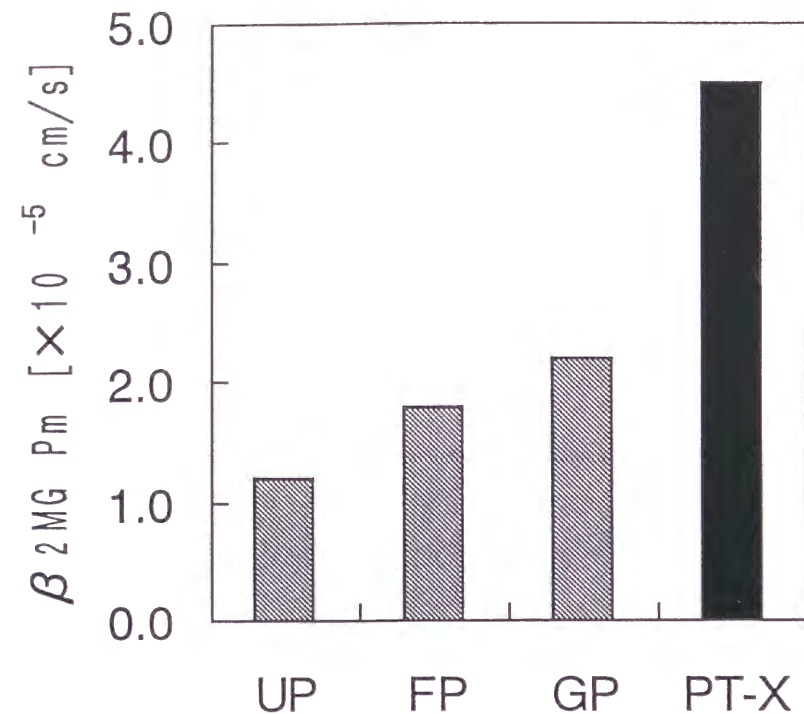


図 5 - 6 . 試作膜「P T - X」の透過性能

#### [ 5 - 4 ] セルロース膜の生体適合性技術

セルロース膜の生体適合性改良方法として、従来から種々の化学改質法が提案され採用されてきている。その主なものは、膜表面にポリエチレングリコール鎖をグラフト反応させたもの、アミノアルキル基を付加反応させたもの、さらにはビタミン-Eを固定化したものが最近報告されているが、いずれの方法においてもセルロースが有するグルコース水酸基の反応性を利用することによってセルロース膜の改質が行われている。

分子鎖末端にアルキル部をもったアルキルポリエチレングリコール鎖をセルロース膜表面にグラフト反応させて改質を行った旭メディカル「AM-PC」、  
「AM-BCP」シリーズは発表以来、実績に基づいた高い評価が得られている。

この改質方法による効果発現のメカニズムは、従来から筏<sup>5)</sup>らにより、いわゆる「散漫層」の概念が提唱されてきたが、セルロース膜表面における「散漫層」の存在を検証し、膜表面をキャラクタライズした例はいまだ報告されていない。

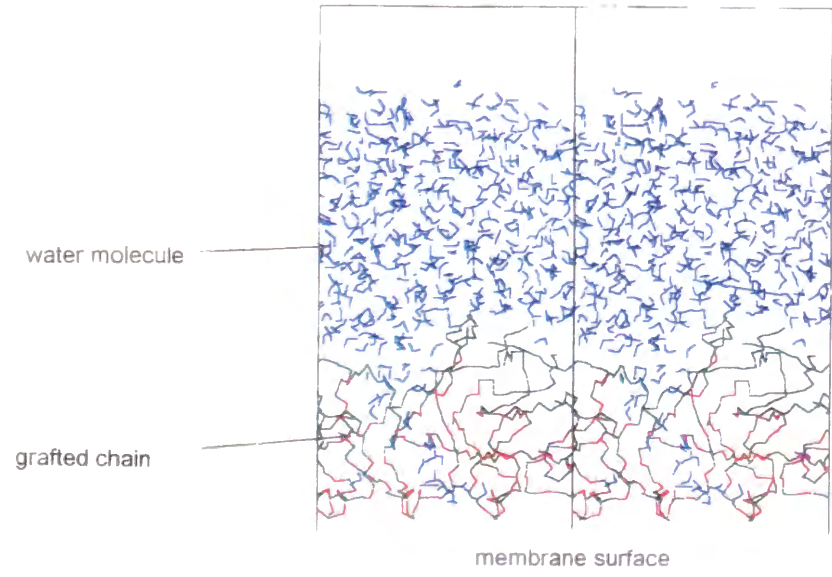
今回われわれは、分子動力学による計算機シミュレーションによってセルロース膜表面におけるグラフト鎖のコンフォメーション計算を行い、膜表面状態のシミュレーションを試みた。セルロースに対して150 ppm相当のグラフト鎖を均一等間隔に配置した系で、グラフト分子鎖内および隣り合った分子鎖間の相互作用、溶媒水分子との相互作用を計算し、系の自由エネルギーが極小化された平衡状態に到達するまで逐次計算を行った。その結果得られた平衡状態でのサンプリング結果と、セルロース膜表面からの各分子の相対密度を図5-7に示す。

図5-7に示されるように、セルロース膜の表面においてグラフト鎖は比較的伸張したコンフォメーションをとっており、約25 Åの厚みをもった「散漫層」、すなわち溶媒水分子を抱き込んだ「水和ゲル層」が膜表面に形成されていることが検証できる。

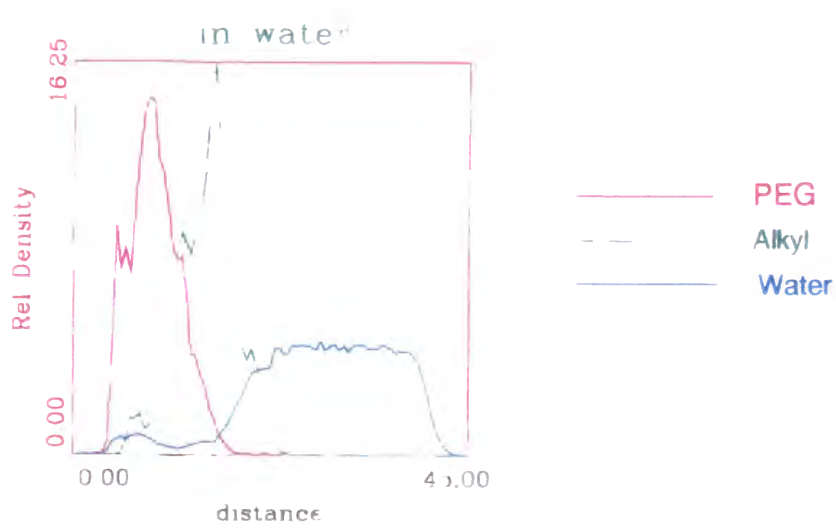
この水和ゲル層が血中成分とセルロース膜表面との接触を緩衝する結果、図5-8に示すように補体活性等の血中成分の刺激が抑制された生体適合性が発現されているものと理解される。



a) Structure of Alkyl ether chain



b) Equilibrium state



c) Relative density profile of chain segments and water on membrane surface

図 5-7. アルキルポリエチレングリコール鎖グラフト改質セルロース膜表面の分子動力学シミュレーション

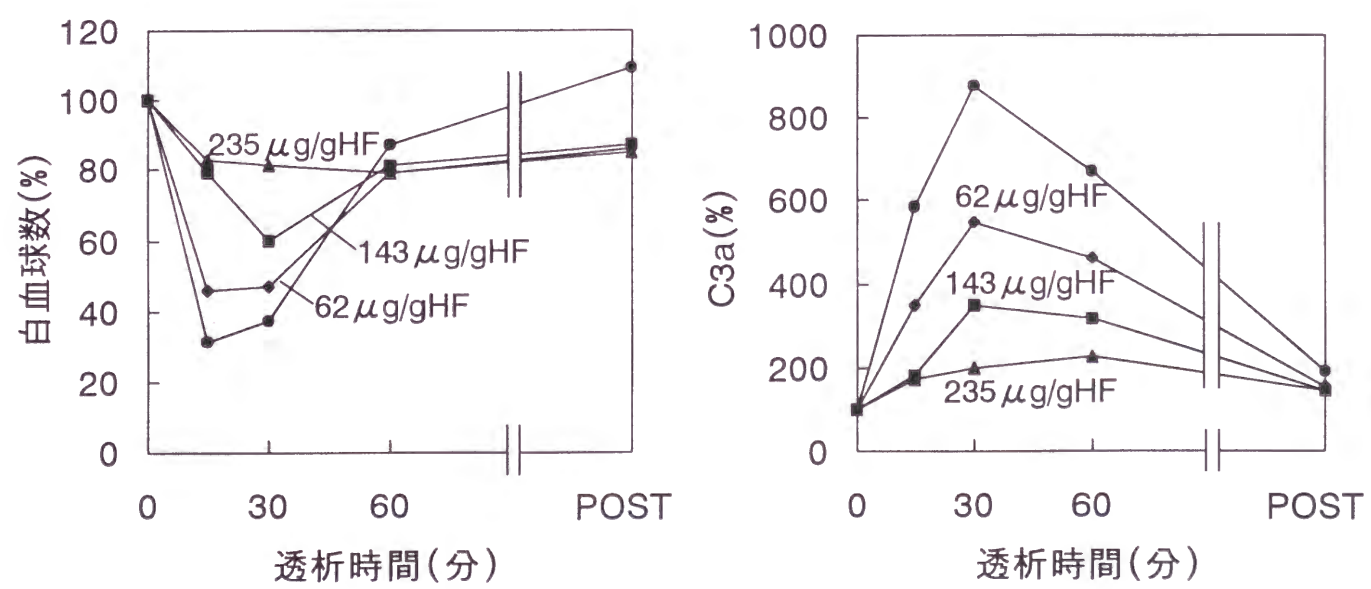


図5-8. AM-BC-150Pの生体適合性



## [ 5 - 5 ] ま と め

以上、セルロース膜における製膜技術の最近の進歩の一例として、膜の孔構造デザインの考え方と対称グラジエント構造膜の特徴とその有効性、およびアルキルポリエチレングリコール鎖グラフト改質法による生体適合性発現に関する基礎メカニズムについて記した。これらの技術進歩は、医療技術の変化に伴う新たな市場ニーズへの対応によってもたらされている。製膜技術の進歩は膜メーカーのみがもたらし得るものではないことはいうまでもない。医療側においては製膜技術の進歩を評価し活用することによって更に新たなニーズが生み出される、いわば「技術再生産のプロセス」が健全である限り、製膜技術は今後も継続的な進歩を遂げるものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Kamide K: Thermodynamics of Polymer Solution Phase Equilibria Critical Phenomena In Jenkins AD(ed): Polymer Science Library 9. p442, Elsevier Amsterdam, (1990)
- 2) 秋澤忠男, 筏 義人: 「セルロース膜表面の改善と生体適合性」人工臓器18(3): 1170-1174. (1989)
- 3) Bingel M Arndt W Schulze H. et al: Comparative study of C5a plasma levels with different hemodialysis membranes using an enzyme linked immnosorbent assay, Nephron 51: 320-324, (1989)
- 4) 樋口千恵子, 他: 「ビタミンE固定化ダイアライザー (CL-ES15) の生体適合性の検討」。腎と透析, 38別冊「ハイパフォーマンスマンブレン'95」125. (1995)
- 5) 筏 義人, 他: 表面27(10): 777 (1989)

## 第 6 章 対称グラジエント型セルロース

### 血液透析膜の構造と特性について

## [ 6 - 1 ] 緒 言

慢性腎不全患者に対する血液透析療法が始められて以来30年余が過ぎている。当初の約10年間は尿素などの小分子量物質のみを除去対称物質とした治療が行われてきたが、1985年に下条らにより透析アミロイド症の線維形成タンパクが分子量11,800の $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -MG) であることが明らかにされて以来、孔径 (ポアサイズ) が大きく、低分子量タンパクの除去効率に優れた中空糸膜が high-performance membrane (HPM) と呼ばれ、急速に普及してきている。この HPM は、従来から孔径が比較的大きい合成高分子素材膜を中心に開発が進められてきているが、従来はその孔径拡大は困難とされた再生セルロース膜について孔径の拡大化を試みた。

又、孔径の拡大化が進む一方において、HPM膜透析器を用いた血液透析では、透析液から血液への発熱性物質の逆流という逆効果の一面も同時に指摘されている。本章では、新規な孔径分布構造である対称グラジエント構造膜 (PT-X) の透析濾側から血液側への逆透過特性に関する研究の結果を述べる。

## [ 6 - 2 ] 再生セルロース中空糸膜の紡糸プロセスと構造制御の原理

再生セルロース膜の湿式紡糸プロセスの大略は、紡口より排出された銅アンモニアセルロース溶液を凝固させる凝固工程、次いで精練再生を行う再生工程、そして乾燥工程と巻き取り工程に大別される。中空糸膜の物質透過性を支配する膜の孔径と孔構造は、主に凝固工程において決定されている。銅アンモニアセルロース溶液の凝固の工程は、スピノダル分解機構による熱力学的相変化の過程であり、均一溶液のミクロ相分離を伴って進行する<sup>1)</sup>。スピノダル分解は、熱力学的に不安定な状態におかれたポリマー溶液が、ポリマー濃厚相と稀薄相に分離する

ことによって、熱力学的安定状態を保つものである。このマイクロ相分離の過程はセルロースポリマーの凝集核生成と成長によって進行する。成長した凝集核は1次粒子形成し、さらに1次粒子が融合して数百ナノメートルの2次～数次の粒子となり、成長した粒子が積層して膜構造マトリックスが形成される。膜の孔は粒子が充填されていない部分に形成されることになる。従って、セルロース中空糸膜の孔径と孔構造は、この相分離過程における粒子形成と積層の状態を制御することによってコントロールすることが出来る。今日では、この膜構造形成原理に基づいて、次に記すような種々の孔構造デザインが可能になっている。

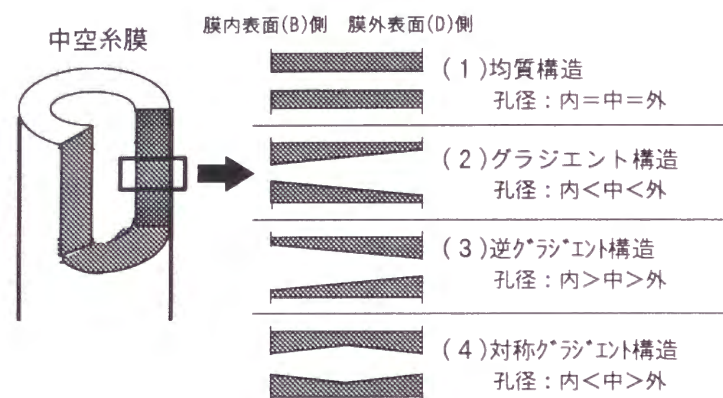


図6-1. 透析膜の孔構造

### [ 6 - 3 ] 血液透析膜の膜の孔構造設計

血液透析用中空糸膜の孔構造は、主に図6-1に示す4種類のタイプに分類できる。(1)の均質構造膜は、膜厚断面の内表面から外表面にかけて均一な孔径を有する構造であり、再生セルロース膜に一般的に見られる構造である。

(2)は内表面から外表面に向かって孔径が大きくなるグラジエント構造と呼ばれる構造であり、従来、合成高分子系膜に多く見られていた構造である。当該構造は(1)の均質構造膜に比べて物質の透過抵抗は小さいが、拡散あるいは濾過による外表面(D)側から内表面(B)側への逆透過量が多いことが危惧された。

(3)は(2)とは逆の構造であり、逆グラジエント構造と呼ばれる。B側からの血

液中タンパク質成分の目詰まりが多いことが危惧された。

(4)は、膜厚中央部分の孔径が大きく内外表面近傍の孔径が比較的小さい対称グラジエントの孔構造であり、従来の血液透析膜にはみられなかった新規な孔構造である。

対称グラジエント構造膜は、(1)の均質構造膜の膜厚中央部の孔径を大きくした孔構造であるので、均質構造膜よりも物質透過抵抗を小さくできる。また、膜内表面側の孔径を均質構造膜と同程度に維持することによって、分画性を損なうことなく透過抵抗を低減することができ、血液中タンパク質成分の目詰まりも均質構造膜と同程度に抑制できる。さらに、対称グラジエント構造膜では、膜外表面近傍の孔径を膜厚中央部の孔径より小さくし、適切化することでD側からの物質の逆透過を抑制できる可能性がある。

以上のことから、(1)～(4)の孔構造において、対称グラジエント構造が血液透析膜として最も理想的な孔構造であると考えられた。

我々は上記の孔構造デザインコンセプトに基づき、対称グラジエント孔構造再生セルロース膜(PT-X)を試作した。

### [ 6 - 4 ] 解析方法

対称グラジエント再生セルロース膜(PT-X)の孔構造と特性について、種々の観点から評価、解析を行い、他の3タイプの孔構造膜との差異を明らかにすることを試みた。

#### 6-4-1. サンプル

対称グラジエント再生セルロース膜(旭メディカル㈱AM-UP, AM-FP, AM-GP)および試作した均質構造膜、逆グラジエント構造膜、対称グラジエント構造膜(PT-X)を評価、解析に供した。各膜の仕様を表6-1に示す。なお、均質構造膜、逆グラジエント構造膜および対称グラジエント構造膜については、各々、膜厚断面の孔径が異なる(従って、UFR,  $\beta$ 2-MGのPm等の膜性能が異なる)数種類のサンプルを試作した。



表 6 - 1 . 中空糸膜サンプルの仕様

孔構造	透析膜	内径(Dry) [ $\mu\text{m}$ ]	膜厚(Dry) [ $\mu\text{m}$ ]	U F R (水系) [ $\text{ml}/\text{m}^2\text{hrmmHg}$ ]
均質	A M - U P	1 8 5	1 5	1 2
	A M - F P	1 8 5	1 5	1 9
	A M - G P	1 8 5	1 5	2 1
	試作膜	1 8 0	1 5	1 8 ~ 4 0
逆グラジエント	試作膜	1 8 0	1 5	4 0 ~ 1 0 0
対称グラジエント	<P T - X>	1 8 0	1 5	3 3 ~ 7 9

6 - 4 - 2 . 孔構造観察および孔径分布の測定

以下の方法により、膜厚断面の孔構造を透過型電子顕微鏡 ( T E M ) で観察し、得られた T E M 写真を画像解析処理することで孔径分布を測定した。

- ①水湿潤試料膜を 30,50,70,80,90,95,100%エタノール ( 水 ) 溶液にて、順次脱水置換 ( 脱水条件は各々  $25^{\circ}\text{C} \times 30 \text{ min}$  ) .
- ②エポキシ樹脂で包埋 (  $60^{\circ}\text{C} \times 24 \text{ hr}$  ) .
- ③70nm厚みの膜厚断面の切片を作製.
- ④0.2%クエン酸鉛水溶液で染色.
- ⑤T E Mにて、膜断面の孔構造を観察.
- ⑥T E M写真を画像解析処理 ( 高精細画像処理システム、旭化成工業IP-1000PC ) .

膜厚断面の任意の位置での孔部分の面積を読みとり、円相当孔径および孔径分布を求めた。

6 - 4 - 3 . 溶質透過係数の測定<sup>3)</sup>

長さ16cm、中空糸本数80~120本の中空糸束の両端をシリコン接着剤で固定した膜面積約100cm<sup>2</sup>のミニモジュールを用い、密閉式物質移動係数測定装置にて溶質透

過係数 ( P m ) を測定した。ミニモジュール内の試験溶液流量は、血液側境膜の影響を無視できるように、線速度が100cm/min となるように設定した。また、透析液側境膜の影響を無視できるように、ミニモジュール周囲は、マグネチックスターラーにて充分に攪拌した。試験溶液として  $\beta$  2 - M G を用いた。

時間 0 分、120分において、血液側及び透析液側溶液濃度を測定し、溶質透過係数 ( P m ) を算出した。

6 - 4 - 4 . 篩係数の測定

前述 4 . 3 と同様のミニモジュールを用い、濾過圧力 ( T M P ) 50mmHg ( ウシ血清係 ) または200mmHg ( 生理食塩水系 ) で、定圧ろ過を行った。試験溶液流量は、P m 測定時と同様に線速度100cm/minとなるように設定した。試験溶質として、アルミブミンを用いた。

約 2 m l の濾液をサンプリングし、ろ過前後の試験溶液濃度を測定して篩係数 ( S C ) を算出した。

6 - 4 - 5 . 溶質透過流束の測定

測定装置の概略を図 6 - 2 に示す。膜表面積約100cm<sup>2</sup>の小型透析器を作製した。B 側に試験水溶液を流量 3 m l / min ( 実際の透析器での Q <sub>B</sub> = 200 m l / min に相当 ) 、D 側に純水を流量 4 ~ 5 m l / min ( Q <sub>D</sub> = 500 m l / min に相当 ) で灌流させ、時間 0 分、120分において、B 側およびD 側の溶液濃度を測定し、B 側からD 側への溶質透過流束 J <sub>s1</sub> を求めた。次に、試験水溶液と純水を入れ替え、D 側からB 側への溶質透過流束 J <sub>s2</sub> を求めた。net Q <sub>F</sub> = 0 m l / min とした。

試験溶液として、①イヌリン ( M W : 5,200 ) , F I T C 標識したリボポリサッカライド ( F I T C - L P S , 6000 < M W < 1 0 <sup>7</sup> ) を用いた。

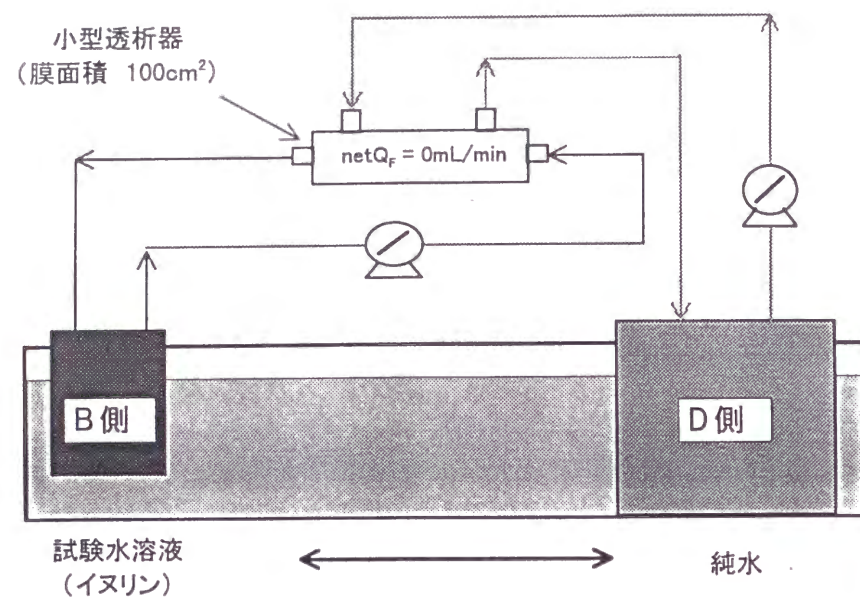


図6-2. 透析液側から血液側へのLPS浸透量測定装置

#### 6-4-6. タンパク質捕捉量の測定

血液中タンパク質の中空系膜厚み部分への浸透性を、タンパク質の膜厚み部分での捕捉量で評価した。

- ① 前述6-4-3, 6-4-4と同様のミニモジュールを作成し、生理食塩水に1hr漬した後、アスピレータで生理食塩水を除去した。
- ② ウシ血漿を中空内に充填し、37°C, 60 minの条件で接触させた。
- ③ 終了後アスピレータでウシ血漿を除去した。
- ④ BCAプロテインアッセイ試薬を用いて、膜厚み部分に捕捉されているタンパク質を定量した。

#### 6-4-7. 湿潤時の機械的強度（破裂強度）の測定

湿潤時の機械的強度を破裂強度測定で評価した。中空系1本の両端をシリコン接着剤で測定器台上に固定し、両端面の中空部が開口するようにシリコン部を切断した。中空系の両開口面から中空内に圧力を加えた。加圧力を1~12kg/cm<sup>2</sup>の範囲で連続的に変化させ、膜が破裂する際の限界圧力を破裂強度とした。

### [6-5] 結果と考察

#### 6-5-1. 対称グラジエント構造膜 (PT-X) の孔構造

対称グラジエント構造膜 (PT-X) の膜厚断面での孔構造のTEM写真を図6-3に示す。図6-3で黒く見える部分が、クエン酸鉛水溶液で染色されたセルロースの粒子に相当する。白く見えるのが、粒子間の「空隙」、すなわち「孔」に相当する。膜内表面および外表面側が比較的黒く見えるのは、孔径の小さい緻密な孔構造であるためである。一方、膜中央部が白く見えるのは、内、外表面側に比べて孔径の大きいポラスな孔構造であるためである。

PT-Xの膜厚断面での円相当孔径を図6-4に示す。比較対照として、従来の均質構造膜 (AM-GP) と逆グラジエント構造膜 (試作膜) の円相当孔径を示す。

図6-4において、均質膜では膜内表面から外表面に向かって孔径がほぼ一定であり、逆グラジエント膜では膜内表面から外表面に向かって孔径が徐々に小さくなっている。それに対しPT-Xでは、膜厚中央部分の孔径が最も大きく、内外表面近傍の孔径が小さい「対称グラジエント」の孔構造になっていることがわかる。

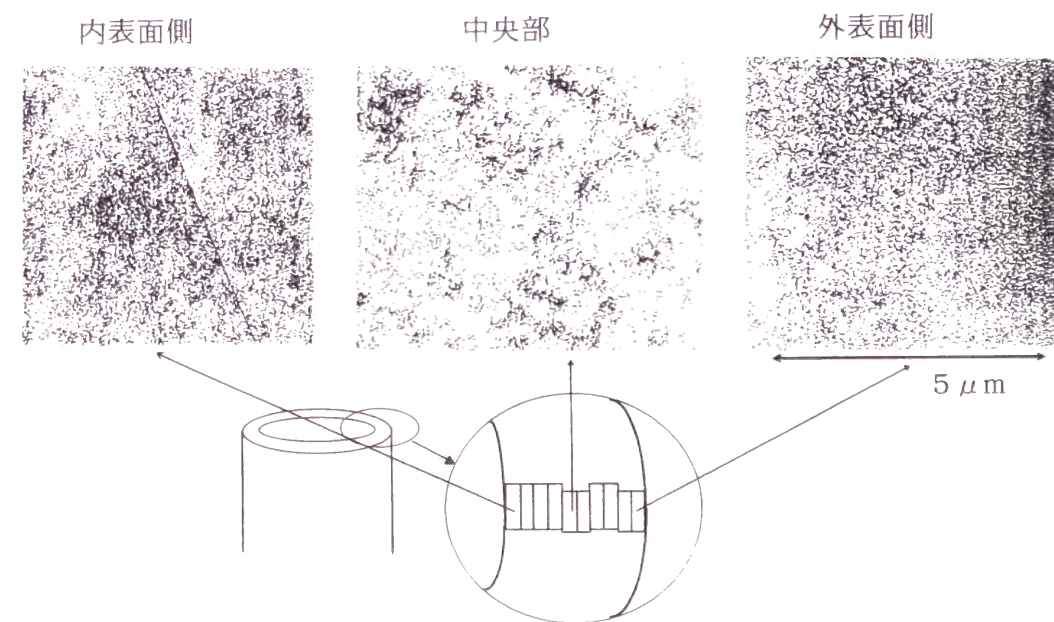


図6-3. 対称グラジエント構造膜の膜断面TEM写真

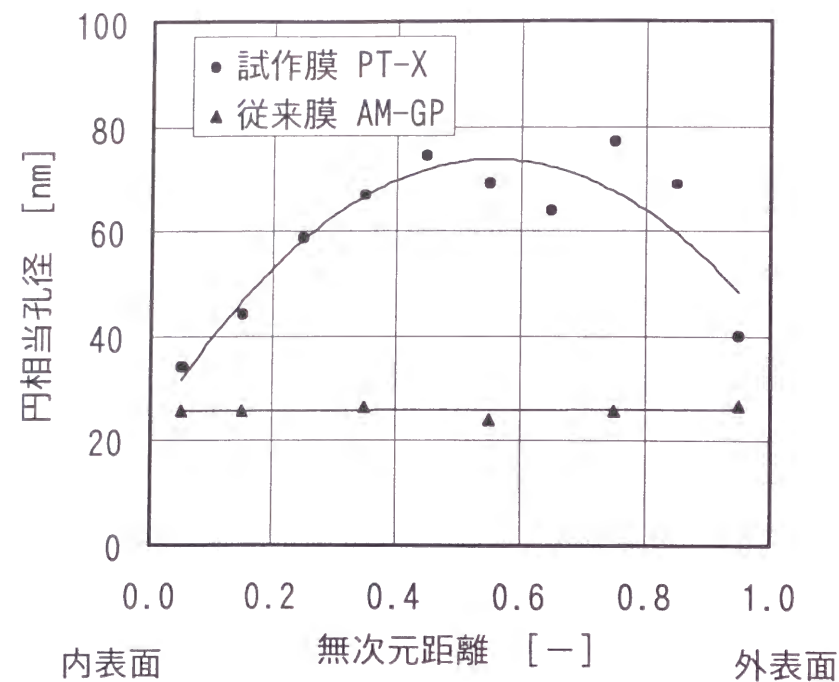


図 6-4. 膜厚方向孔径分布

#### 6-5-2. 対称グラジエント構造膜 (PT-X) の特徴

##### a) 溶質透過係数と篩係数

PT-X の  $\beta_2$ -MG 溶質透過係数 (Pm) とアルブミン篩係数 (SC) を図 6-5 に示す。従来の再生セルロース HPM 膜 (AM-UP, AM-FP, AM-GP) と比較した。AM-GP と比べて、PT-X の  $\beta_2$ -MG Pm は 2 倍程度である一方、アルブミン SC の値は AM-GP とほぼ同じレベルに抑えられた。

さらに、均質構造膜と対称グラジエント構造膜の、 $\beta_2$ -MG の Pm とアルブミン SC との関係、UFR とアルブミン SC との関係を図 6-6 に示す。 $\beta_2$ -MG の Pm あるいは UFR の増加に伴って、均質構造膜ではアルブミン SC が大きく増加するが、対称グラジエント構造膜ではアルブミン SC の増加は緩やかである。

これらのことから、対称グラジエント構造膜では均質構造膜に比べて、アルブミン SC を低値に抑え (分画性を維持し) つつ、 $\beta_2$ -MG の Pm (透過性能) を大きくすることが出来ている。

なお、 $\beta_2$ -MG の Pm はほぼ UFR に依存しているので、以降では UFR をパラメータとして評価解析を行った。

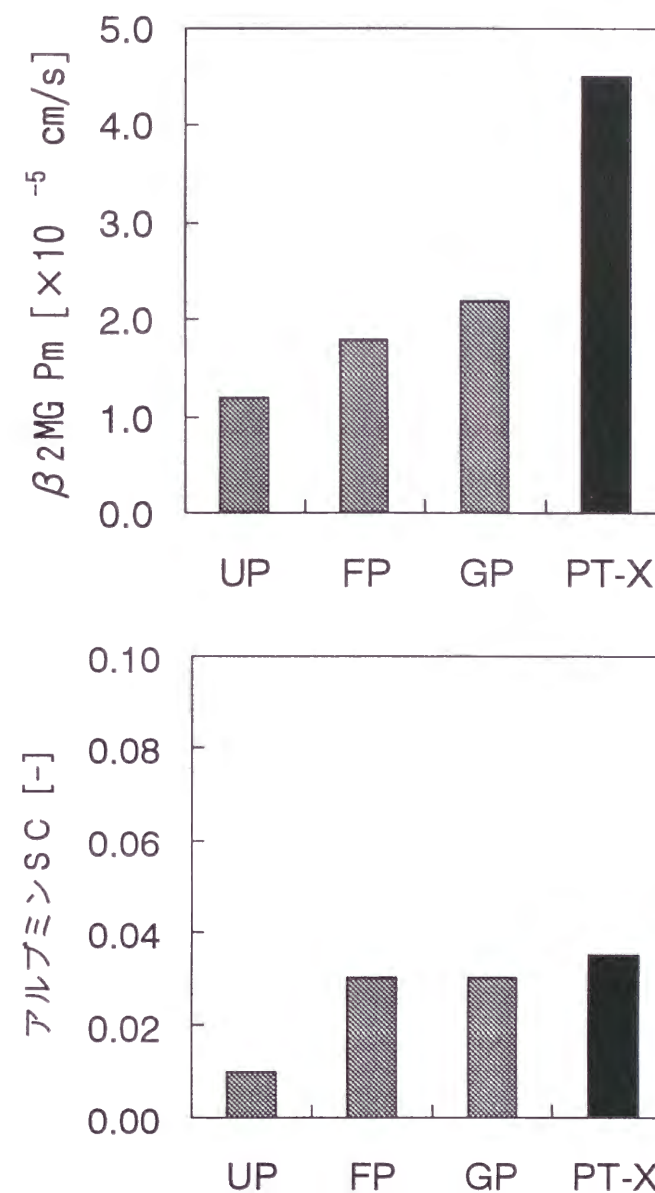


図 6-5. 対称グラジエント孔構造試作膜の溶質透過性



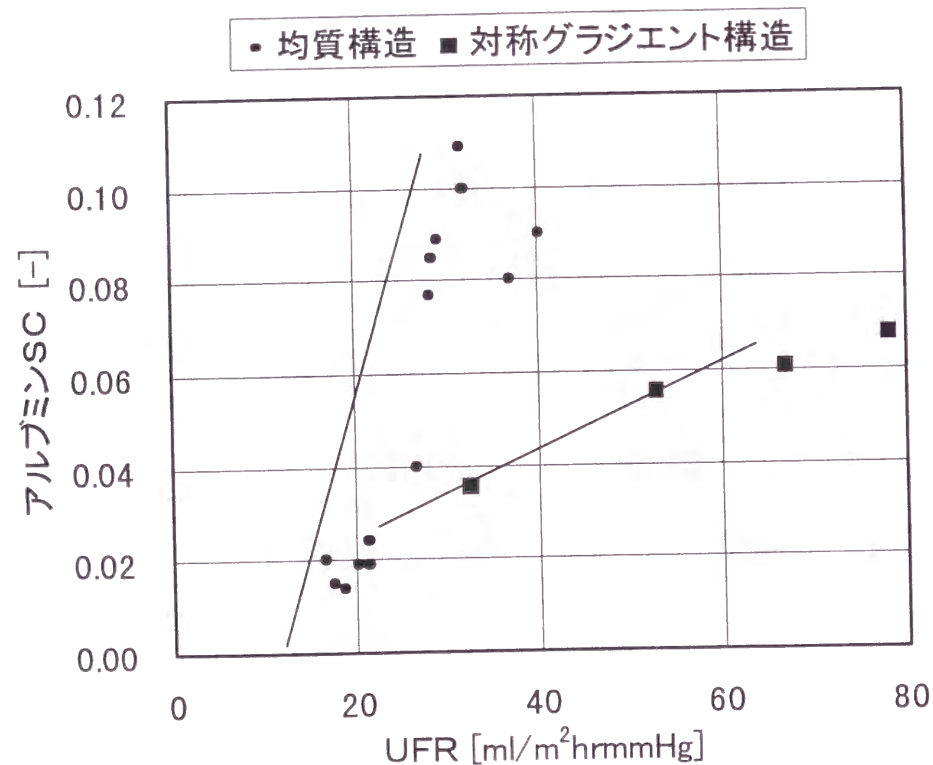
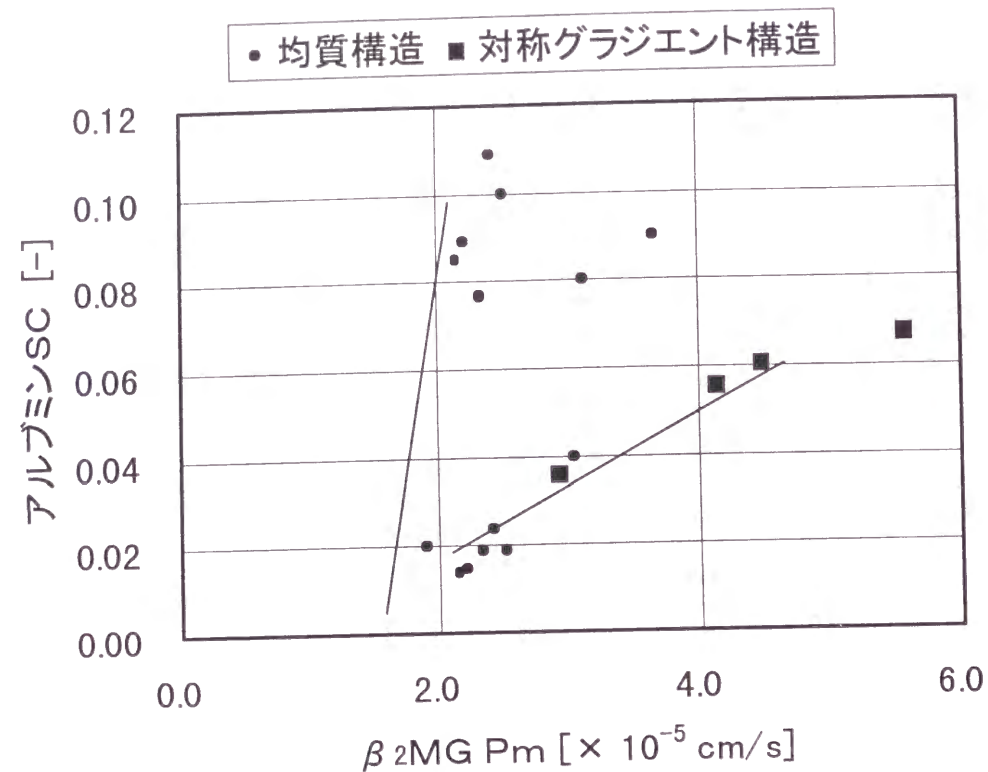


図 6 - 6 . 孔構造とアルブミン篩係数

b) 透析液側から血液側への逆透過量

イヌリン (MW : 5,200) の膜内表面 (B) 側から外表面 (D) 側への透過流速  $J_{s1}$ , D 側から B 側への透過流速  $J_{s2}$ , およびそれらの比 ( $J_{s2} / J_{s1}$ ) を表 6 - 2 に示す。

均質構造膜と対称グラジエント構造膜では、 $J_{s1}$  と  $J_{s2}$  はほぼ同じ値であり、これは孔構造の対称性に対応すると考えられた。一方、グラジエント構造膜では  $J_{s2}$  の方が相対的に大きいことから、バックフィルトレーションによる D 側から B 側への逆透過が多いことが示唆される。

さらに、均質膜と対称グラジエント膜の FITC-LPS の逆透過流束  $J_{s2}$  を比較した。各々の UFR と  $J_{s2}$  との関係を図 6 - 7 に示す。

均質膜と対称グラジエント膜の UFR が同値である場合、 $J_{s2}$  は対称グラジエント膜の方が小さかった。これは、対称グラジエント膜の膜断面での孔径分布に依存すると考えられる。

従来の均質膜では、透過性能を高く（できるように、孔径を大きく）すると透析液側から血液側への逆透過が大きくなることが危惧されたが、対称グラジエント膜ではこれを解決できる可能性があることが示唆される。

表 6 - 2 . 孔構造と透過異方性 (イヌリン) の比較

孔構造	孔径分布の模式図 B側 ←→ D側	物質透過流束		
		$J_{s1}(B \rightarrow D)$	$J_{s2}(D \rightarrow B)$	$J_{s2} / J_{s1}$
均質		2.4	2.0	0.83
グラジエント		3.6	5.5	1.53
対称 グラジエント (PT-X)		3.3	3.2	0.97



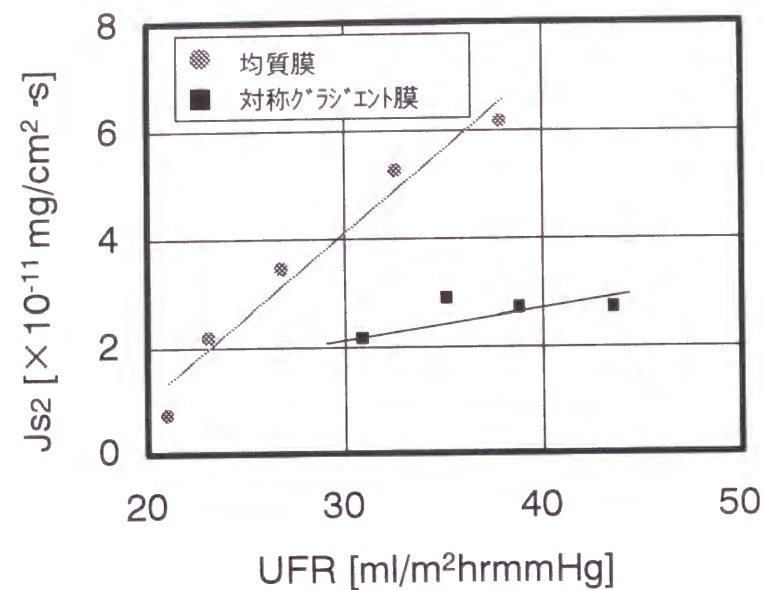


図6-7. FITC-LPS逆透過流束のUFR依存性

#### c) タンパク質捕捉量

前述4.1で示した3種類の膜（AM-GP，試作膜およびPT-X）の、血液中タンパク質成分の膜厚み部分での捕捉量を表6-3に示す。

PT-Xでは、TMPが高い場合、血中成分の膜厚み部分での捕捉量が多いことが危惧されたが、その量は既存のAM-GPとほぼ同程度であった。一方、膜内表面側の孔径が大きい逆グラジエント構造の試作膜では、PT-XおよびAM-GPより血中成分の捕捉量は大きかった。

血液中タンパク質成分が膜厚み部分に捕捉されることによって、特にキニン-カリクレイン系の代謝が阻害されやすい<sup>2)</sup>。従って、血中成分を捕捉しやすい逆グラジエント構造は、血液透析膜としては好ましくない構造であると考えられる。

#### d) 湿潤時の機械的強度（破裂強度）

均質膜と対称グラジエント膜（PT-X）の破裂強度を図6-8に示す。PT

破裂強度を高く維持できている。従って、対称グラジエント構造膜では、湿潤時の機械的強度も維持されることが明らかになった。

表6-3. 膜の孔構造とタンパク捕捉量の比較

孔構造 (銘柄)	孔径分布の模式図 B側 ← → D側	タンパク捕捉量 [μg/g-膜]
均質 (AM-GP)		24
逆グラジエント		62
対称 グラジエント (PT-X)		26

● ■ ○ : 血液中タンパク質成分を表す。

#### 記号

$J_{s1}$  [mg/cm² · s]: B側からD側への溶質透過流束  
 $J_{s2}$  [mg/cm² · s]: D側からB側への溶質透過流束  
 $net Q_f$  [ml/min]: 正味の濾過流量  
 $P_m$  [× 10⁻⁵ cm/sec]: 溶質透過係数  
 $Sc$  [-]: 篩係数

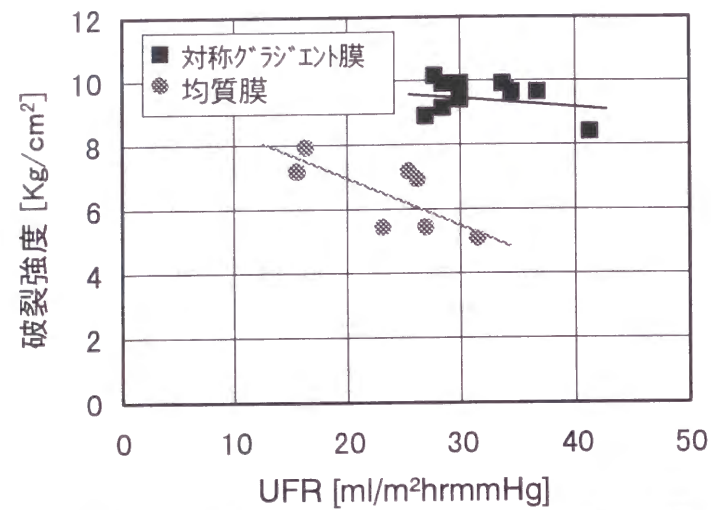


図6-8. 膜強度のUFR依存性と孔構造比較

#### [6-6] おわりに

従来は、孔径制御が難しいとされてきた銅アンモニア法再生セルロース膜においても高度な孔径制御が可能であり、対称グラジエントな孔構造を有する試作膜の開発に成功した。また、対称グラジエント孔構造膜は、

- ①物質透過抵抗が小さい
- ②透析液側からの逆透過量が少ない
- ③血中成分目詰まりが少ない
- ④湿潤時の機械的強度が強い

等の特性を持つことが明らかとなり、血液透析膜に要求される理想的な孔構造を持った中空糸膜に更に一步近付けたと考えられる。

#### 文 献

- 1) Kamide K: Thermodynamics of Polymer Solution Phase Equilibria Critical Phenomena In Jenkins AD(ed): Polymer Science Library 9. p442(190)
- 2) Verresen, L., et al., Kidney International, 45, 1497(1994)
- 3) 山本卓也, 他, 腎と透析, 1989年別冊「ハイパフォーマンスメンブレン'89」60(1989)

## 第7章 高透過性PEGグラフト再生セルロース膜

### “BC-F”の特徴と臨床性能

#### [7-1] 緒 言

新たに開発された高透過性セルロース膜《AM-BC-F》は、

- ①マイルドHPMとしての十分な溶質除去性能
- ②中空糸膜内表面の平滑化による血液適合性
- ③散漫層による生体適合性

等の優れた特徴を有する。これらの特徴は、従来製膜法とは異なる新たな製膜技術と分子末端にアルキル部分を持ったアルキルポリエチレングリコール鎖（以下、PEG鎖とする）によるセルロース膜表面改質に因るものである。これらの特徴を臨床試験及び*in vitro*試験において検証した。

《AM-BC-F》膜では、

- ①新しい製膜法の採用によって膜内表面構造の平滑性を高め（図7-1）、中空糸内表面での血液の流動抵抗を軽減して血液適合性を向上させる。
- ②PEG鎖をセルロース膜内表面に反応させて（図7-2）、ポリマーの疎水性基・親水性基のバランスによって膜表面に形成される「散漫層（PEG鎖の水和ゲル層）」により、生体適合性を付与させる（図7-3）<sup>1)</sup>ことが可能となっている。

新たな製膜法は、主に、原料である銅アンモニアセルロース溶液の組成と凝固液条件を制御することによって、膜の孔構造を制御する製膜法である<sup>1,2)</sup>。溶液のセルロース濃度を従来よりも低くし、溶液の凝固の過程で形成される2次粒子の径を小さく均一にすることで、膜内

表面の構造を従来よりも平滑にすることができている。

## 〔 7 - 2 〕 試験方法

### 1. サンプル

市販の透析器 A M - F P - 1 5 0、及び新たに作製した A M - B C - 1 5 0 F（いずれも、旭メディカル㈱）を、臨床試験及び *in vitro* 試験に供した（表 7 - 1）。

### 2. 臨床試験

定期血液透析施行中の安定期透析患者 4 名（表 7 - 2）を対象に、2 種類の透析器（A M - F P - 1 5 0、A M - B C - 1 5 0 F）を同一透析条件下にてクロスオーバーで使用した。両透析器の溶質除去率、A M - B C - 1 5 0 F 透析器の補体活性化抑制効果等について検討した。透析条件は、血液流量 2 0 0 ml/min、透析液流量 5 0 0 ml/min、濾過流量一定、平均透析時間を 4. 4 時間とした。

溶質除去率は、尿素窒素（U N）、クレアチニン（C r e .）、尿酸（U A）、無機リン（i P）等の小分子量物質、及び  $\beta$  2 M G、プロラクチン（P R L）、 $\alpha$  1 M G 等の低分子量タンパク質について求めた。低分子量タンパク質の除去率は、ヘマトクリット補正による算出を行った。また、アルブミン漏出量は全排液を貯留しその濃度を測定することにより算出した。

一方、補体活性化抑制効果の評価因子として、白血球数及び活性化補体 C 3 a を測定した。

## 3. *In vitro* 試験

### 3. 1 .ふるい係数の測定<sup>3)</sup>

長さ 1 6 cm の中空糸束の両端をシリコン接着剤で固定した膜面積約 1 0 0 cm<sup>2</sup> のミニモジュールを用い、濾過圧力（T M P）5 0 mmHg（牛血清系）で定圧濾過を行った。試験溶液流量は、線速度が 1 0 0 cm/min となるように設定した。試験溶質として、 $\beta$  2 M G、リゾチーム、プロラクチン、 $\alpha$  1 M G、アルブミンを用いた。

約 2 ml の濾液をサンプリングし、濾過前後の試験溶液中の濃度、濾液中の濃度を測定してふるい係数 S C を算出した。

### 3. 2 .原子間力顕微鏡（A F M）による中空糸膜内表面観察

走査型プローブ顕微鏡 Nano ScopeⅡa (Digital Instruments 社 USA) を用いて、膜内表面の凹凸度合いを測定した。

乾燥状態の中空糸膜断面を剃刀で斜めにカットし、内表面側開口部を上にして、両面テープにて試料台上に固定した。内表面側表面部を走査型プローブ顕微鏡を用いてタッピングモードにて観察した。共振周波数は 2 0 0 ~ 4 0 0 K H z とし、カンチレバー長 1 2 5  $\mu$  m のシリコン単結晶製プローブを用いた。

## 〔 7 - 3 〕 結 果

### 1. 溶質除去率とふるい係数の関係、及びアルブミン漏出量

小分子量物質および低分子量タンパク質の除去率を各々図 7 - 4、図 7 - 5 に示す。

小分子量物質については、A M - F P - 1 5 0 透析器と A M - B C - 1 5 0 F の除去率はほぼ同等であった。一方、 $\beta$  2 M G 除去率は A M - F P - 1 5 0 で 2 2. 3 %、A M - B C - 1 5 0 F で 3 0. 1 %



であり、またプロラクチンの除去率も各々12.1%、23.7%であり、AM-BC-150Fの方が有意に高かった。

また、*in vitro*におけるふるい係数測定では、分子量が1万から4万程度までの領域において、AM-FP膜よりもAM-BC-F膜の方がふるい係数が大きかった。(図7-6)

AM-BC-F膜の分子量が1万から4万程度までの領域でのふるい係数が高値であることによる過度のアルブミン漏出が危惧されたが、平均1.7gであり、問題ないレベルであると考えられた。

## 2. 補体活性化抑制効果

白血球数、活性化C3a量の透析開始時の値に対する変化率を、それぞれ図7-7、図7-8に示す。AM-FP-150に比べて、AM-BC-150Fの白血球数一過性減少は抑制され、C3a活性化量も軽微であることが示された<sup>4)</sup>。

## 〔7-4〕考 察

従来とは異なる新しい製膜方法により製膜され、さらに、PEG鎖を当該膜内表面にグラフト反応させた《BIOREX》膜が開発された。

新たな製膜方法により従来膜とは異なる孔構造の中空糸を製膜することができるが、その結果、AM-BC-F膜はAM-FP膜より分子量1万から4万程度までの領域でのふるい係数が高く、低分子量タンパク質の除去率が高かったと考えられた。

一方、膜内表面の構造(物理的性質)は、膜の化学的性質と共に、膜と血液との相互作用に影響する因子の1つである<sup>5)</sup>。図7-1に示したような膜内表面構造の平滑化によって膜と血液との相互作用が軽減され抗血栓性等に代表される血液適合性に良好な影響を与えられる<sup>5, 6)</sup>。従って、AM-BC-Fでは、従来のAM-PC膜及び

AM-BC-P膜に比べて、さらに優れた血液適合性をもつと考えられる。

生体材料の血液適合性に関しては、従来より血液流動の観点からの研究がなされてきたが、このように、比較的凹凸の小さい血液透析用中空糸膜についても、材料表面の物理的特性と血液流動状態の観点での該研究手法あるいは評価手法が有効であると考えられる。

表 7 - 1 透析器の仕様

透析器	膜面積	中空糸仕様		U F R [ml/hr/mmHg]
		内径 [μm]	膜厚 [μm]	
AM-BC-150P	1.5	180	15	22.0
AM-FP-150	1.5	180	15	27.8
AM-BC-150F	1.5	180	15	27.8

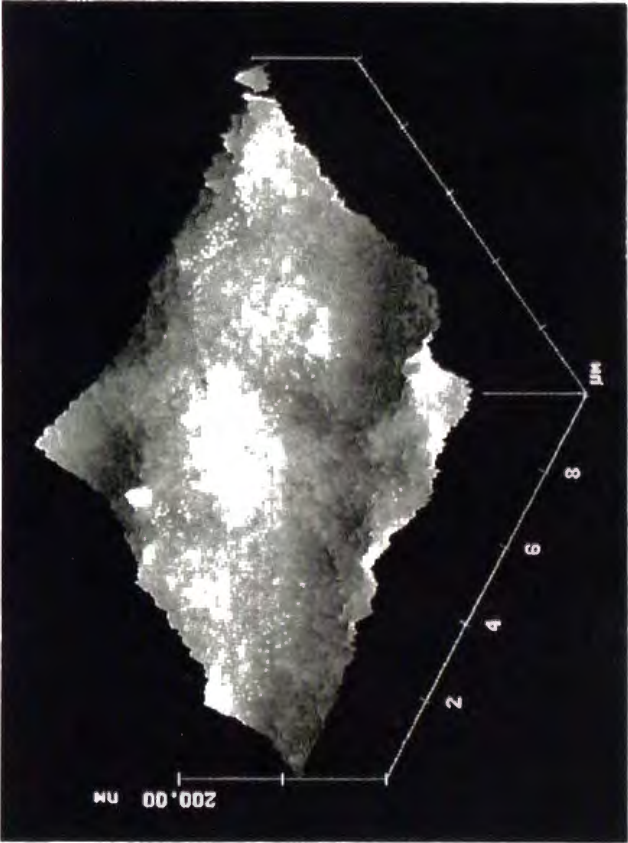
表 7 - 2 対象

安定期透析患者 4 名

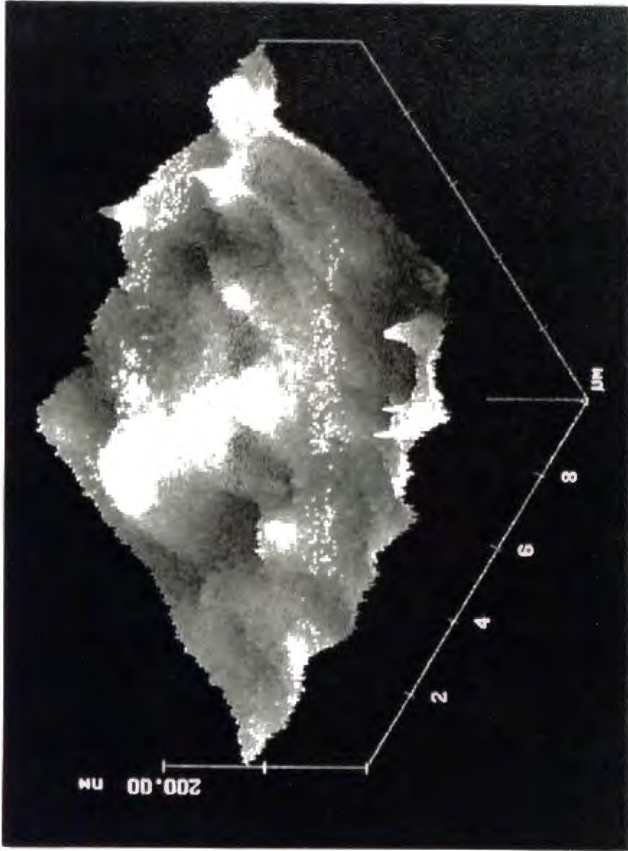
	年齢 [歳]	透析歴 [年]	透析時間 [時間]	血液流量 [ml/min]	ドライウエイト [kg]	抗凝固剤（ヘパリンor低分子ヘパリン）	
						初回[U]	持続[U/hr]
AVG.	61.5	3.9	4.4	200	57.4	1375	825
SD.	8.7	2.0	0.3	0.0	8.8	250	126

表 7 - 3 アルブミン S C と漏出量の関係

透析器	アルブミン S C (in vitro) [-]	アルブミン漏出量 (臨床：Mean,n=4) [g]
AM-FP-150	0.026	2.3
AM-BC-150F	0.020	1.7



a) AM-BCF (BIOREX; improved membrane)



b) AM-BCP (conventional membrane)

図 7 - 1 . A F M (原子間力顕微鏡) による中空糸内表面観察

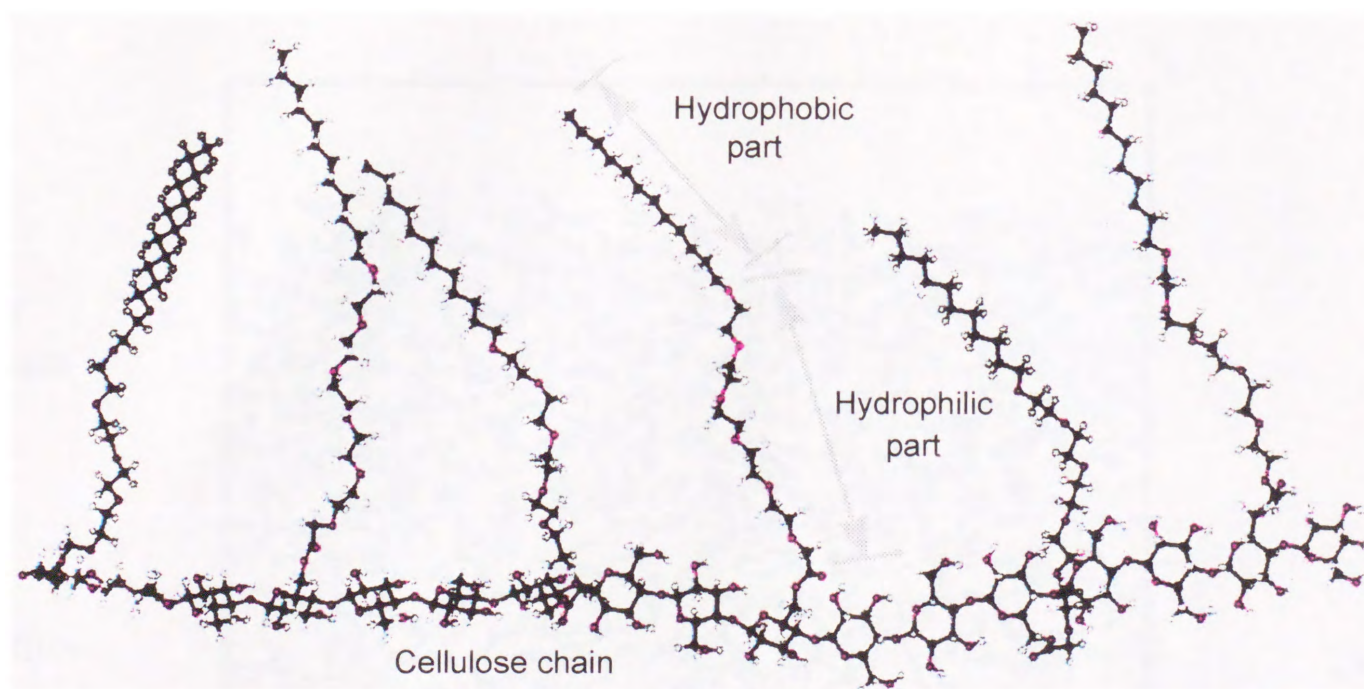


図 7-2. アルキルポリエチレングリコール鎖グラフトセルロースの分子構造



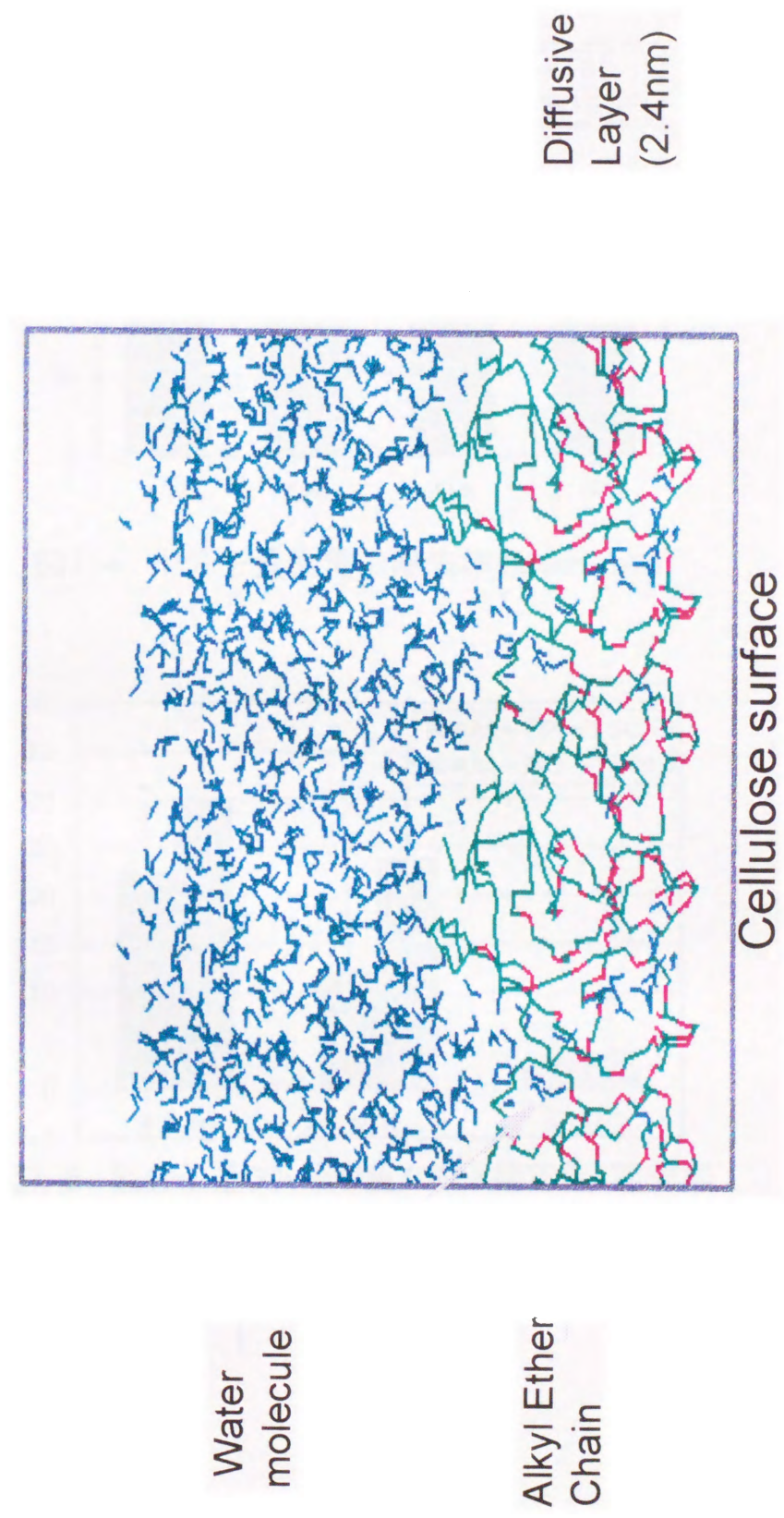


図7-3. PEG鎖グラフトセルロース膜表面の分子動力学法によるシミュレーション結果

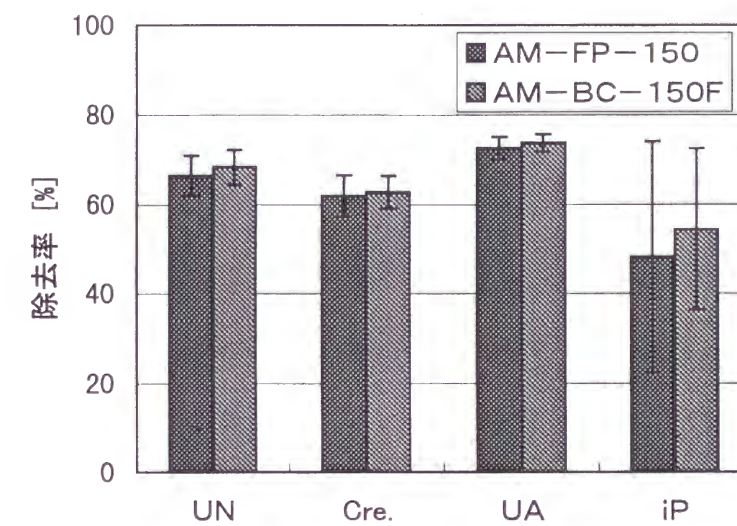


図7-4 小分子量物質の除去率 (Mean, n=4)

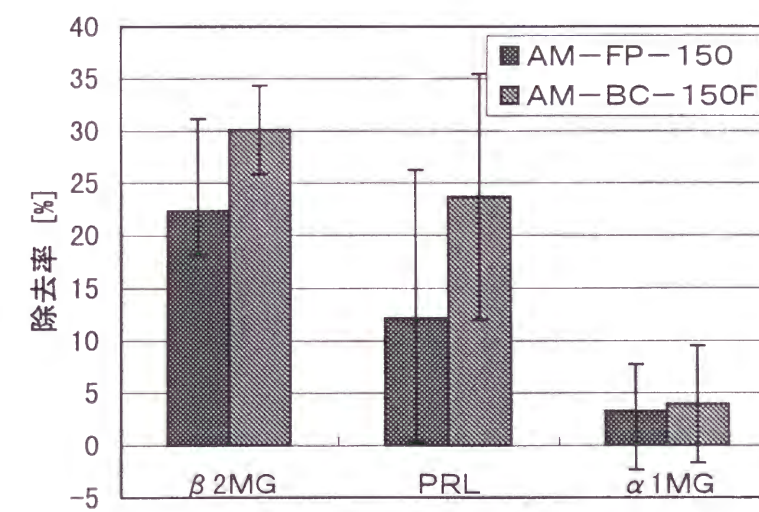


図7-5 低分子量タンパク質の(Ht補正後)除去率 (Mean, n=4)

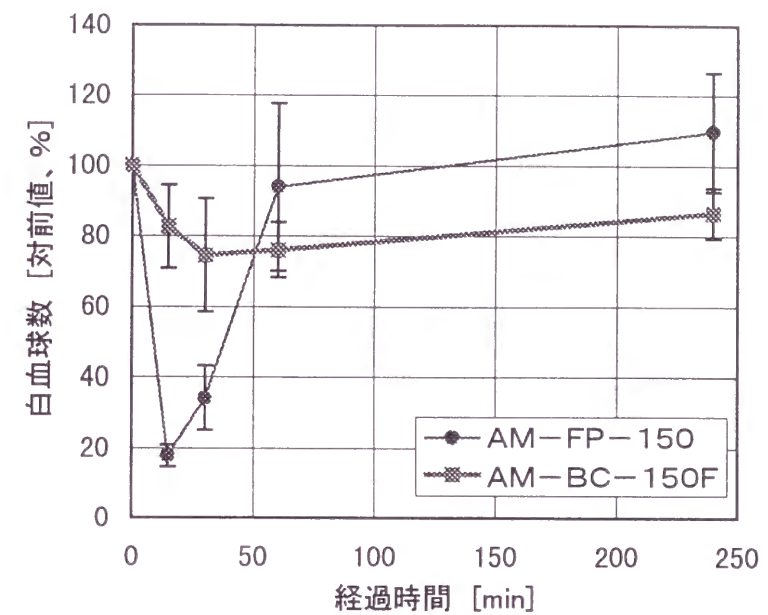
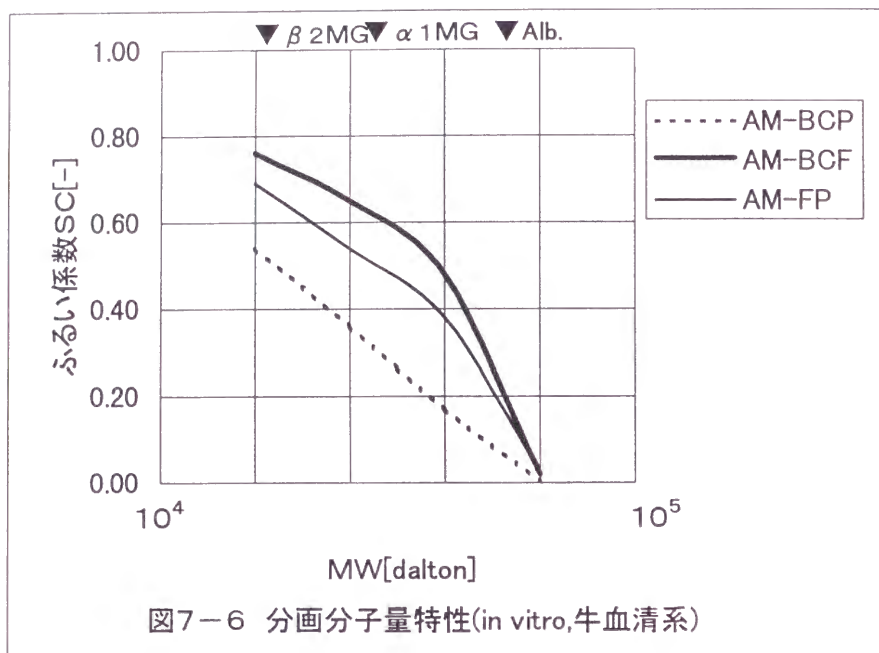


図7-7 白血球数の経時変化(Mean $\pm$ SD、n=4)

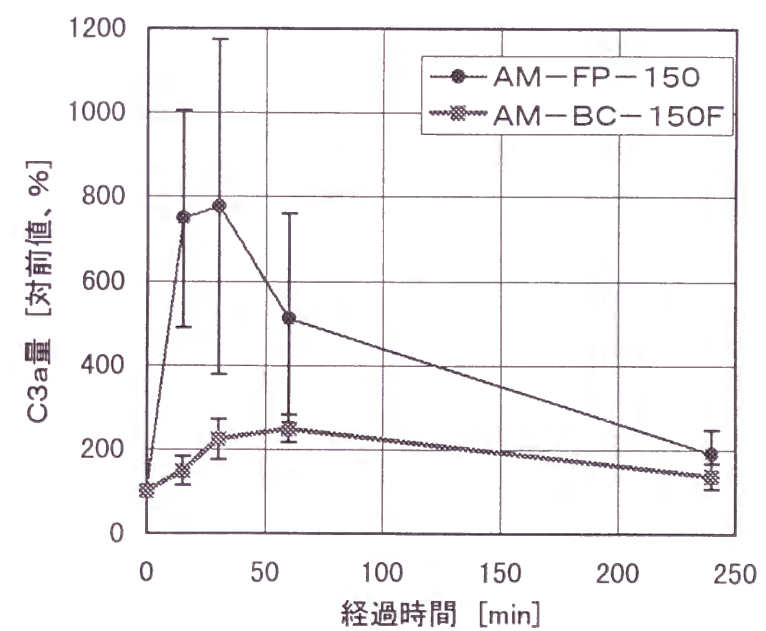


図7-8 C3a量の経時変化(Mean $\pm$ SD、n=4)



## 参考文献

- 1)日吉辰夫：「製膜技術に限界はあるのか」  
腎と透析，別冊「ハイパフォーマンスメンブレン'96」26，(1996)
- 2)宮崎誠他：「対称グラジエント孔構造セルロース膜《P T - X》の構造と各種特性について」，人工臓器26(1):165-170，(1997)
- 3)山本卓也他：「膜のin vitro評価における $\beta$ 2-MG除去能の推定法」  
腎と透析，別冊「ハイパフォーマンスメンブレン'89」60，(1989)
- 4)大段剛他：「大孔径再生セルロース透析膜の  
PEG グラフトによる表面改質－至適グラフト量と臨床効果－」  
人工臓器26(2):418-422，(1997)
- 5)小久保謙一他：「ポリエチレングリコールをグラフトした再生セル  
ロース膜の中空系内流動状態と抗血栓性」  
腎と透析，別冊「ハイパフォーマンスメンブレン'96」52，(1996)
- 6)角田奈々絵他：「透析膜の表面構造が抗血栓性に与える影響」  
人工臓器投稿中

## 第8章 高透過性PEG鎖グラフト再生セルロース膜 の生体適合性

### [8-1] 緒言

長期に渡る血液透析治療において透析膜の生体適合性は重要な意味を持つものである。透析中における補体の活性化については幅広く議論され多くの研究結果が報告されてきた<sup>(1)</sup>。補体の活性化等、生体適合性に関する現象は主に血液と透析膜材料表面との相互作用の結果として現れているものである。透析膜の生体適合性を改良する為には、透析膜表面の改質、或いは修飾方法は極めて重要な意味を持つものであり、従来から種々の改質方法が提案されてきた。その中でも水溶性のポリマー鎖を材料表面にグラフト結合する方法は確実な改良効果をもたらす方法であることが従来から報告されている<sup>(2, 3, 4)</sup>。

アルキルポリエチレングリコール鎖(PEG鎖)をグラフトさせた血液透析膜(AM-Bio，旭メディカル、東京)は補体の活性化を効果的に抑制し優れた抗血栓性を示すことが臨床的にも確認されている。

PEG鎖グラフトセルロース膜は、血漿中蛋白や細胞成分と膜表面との直接的な相互作用を抑制しているものと考えられるが、膜表面において水和性と屈曲性に富んだPEG鎖が水和ゲル層を形成し、血中成分の膜表面への接触や吸着を抑制する結果、生体適合性が発現されているものと考えられている。PEG鎖そのものの血液適合性は、良く知られていることであり、血液に直接注入された場合においても血栓形成がみられない<sup>(2)</sup>。本報告では、補体系、凝固系、及び血小板の活性化を焦点として研究した結果を報告する。特に、血液透析用中空系表面に吸着された血小板の新たな定量方法を開発し、PEG鎖をグラフトした高透過性セルロース膜の補体活性、血小板吸着量に対するグラフト量依存性をin-vitroで精査した。

## 〔 8－2 〕 実験方法

### 8－2－1．PEG 鎖グラフトサンプルの作製

本研究では次の 3 種の  $\gamma$ -線で滅菌されたセルロース中空糸膜を用いている。

(1) 低透過性セルロース膜、(2) 高透過性セルロース膜、(3) PEG 鎖グラフト低透過性セルロース膜 (AM-BIO, 旭メディカル)。そして (2) の高透過性セルロース膜表面に、(3) の修飾に用いられたものと同じ構造を持つ PEG 鎖、即ち片末端にアルキルグループ、他方の末端にカルボキシル基を持ったポリエチレングリコールモノカルボン酸を Kishida らの方法<sup>(4)</sup>により、N,N-dicyclohexylcarbodiimide、Dimethyl-aminopyridine を触媒としてセルロースの水酸基と室温でエステル結合させた。グラフト反応量はアルキルポリエチレングリコールモノカルボン酸の濃度でコントロールし、表 8－1 に示すように中空糸重量に対して 100,200,300,470,865ppm のグラフト反応量を持った 5 種類の試験サンプルを作製した。

### 8－2－2．測定用サンプルモジュールの作製

各測定は、長さ 8 cm、中空系数 300 本で両末端がシリコンにより固定化された測定用サンプルモジュールで行った。作製されたモジュールは、水圧によるリークテストを行いリーク箇所のないことを確認したモジュールを測定に用いている。

### 8－2－3．血小板付着量の測定法

体重が 2.5 ～ 3.0kg の日本種白兔 (雄) から採取された血液を血小板付着量測定用血液として用いた。動脈から採血された血液 9 体積部に対し、濃度 3.8% のクエン酸ナトリウム 1 体積部を混合し、1000rev./min. で 10 分間の遠心分離により高濃度血小板血漿 (PRP) を調整した。調整された PRP に抗凝固剤ヘパリンを 2.0unit/ml 添加した。又、フリーのカルシウムイオン濃度は 5.0mM に調整されている。PRP 中の血小板濃度はコールターカウンターにより測定し、 $5 \times 10^8$  platelet/ml になるように調整した。

モジュールは生理食塩水で 10 分間洗浄した後、1500rev./min. で 5 分間遠心脱

液した。0.5ml の PRP を中空系モジュールに吸い上げ 37℃で 60 分間静置した。

このインキュベーション操作の後に 1500rev./min. で 5 分間遠心脱液し、生理食塩水に 10 分間浸漬することによって中空糸表面に付着していないフリーの血小板を取り除いた。付着した血小板量を定量するために、中空糸は約 1 mm の長さに細断した。細断された中空糸に 1ml の分解液 (PBS 緩衝液中、濃度 0.5% TritonX-100) を加え室温で 1 時間静置した。Stolzenbach<sup>(7)</sup> らの方法に従って分解液中に放出された LDH 量を定量して血小板の付着量を求めている。

又、LDH 量は、既に血小板濃度が既知であるサンプルの酵素活性量測定の結果によって予めキャリブレーションを行った。

### 8－2－4．接触相凝固活性の測定

クエン酸添加牛血漿 3 体積部に対して、60mM, Tris-HCl 水溶液 (pH7.8) を 2 体積部加えて希釈された牛血漿の 0.5ml を中空系モジュールに吸い上げ、4℃で 60 分間静置した。

その後中空系モジュールから回収した牛血漿の 0.1ml に、濃度 10mM の (Z-Phe-Arg-MCA) を 0.12ml、100mM の Tris-HCl 水溶液 (pH8.0) 0.18ml を加えて混合し 40℃で 10 分間静置した。0.1M の酢酸水溶液 2.0ml を加えて反応を停止させ、更に 20% のトリクロロ酢酸を 0.1ml 加えて沈殿物を遠心除去し、7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の量を蛍光法 (Ex:380nm, Em:460nm) により測定した。

### 8－2－5．補体活性の測定

ボランティアから採血した人血漿 0.5ml を中空系モジュールに吸い上げ、37℃で 30 分間静置した。回収された血漿中の C5a を radio-immuno-assay 法 (Amersham International PLC, Amersham) により測定した。

## 〔 8－3 〕 結 果

37℃のインキュベーションにおける透析膜表面への血小板付着量の時間依存性を見た結果を図 8－1 に示す。血小板付着は、5 分後から時間と共に直線的に



増加し120分後でもプラトーに達していない。図8-2は、付着した血小板の付着力を調べる為に、遠心力の依存性を見た結果を表している。37℃で60分間インキュベートすることによりセルロース膜表面に付着した血小板の付着力は極めて強固であり、図8-2に示されるように400Gの遠心力によっても脱離していない。

血小板付着に対する抗凝固剤ヘパリンの添加効果を調べるために、ヘパリン添加量を1unit/mlから10unit/mlまで変化させた結果を図8-3に示す。

血小板付着に於ける2価カチオンの影響が考えられる為、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度は $\text{CaCl}_2$ をPRPに添加することによって常に5mMに制御した。

これらの実験条件依存性について確認した結果に基づいて、各種透析膜サンプルの比較検討のための実験条件は次のように設定した。

インキュベーション時間	: 60分
遠心力	: 400G
ヘパリン添加量	: 2.0 unit/ml

透過性及びPEG鎖グラフト量を変えたセルロース透析膜サンプルの血小板付着測定の結果を図8-4に示す。血小板付着量はグラフト量の増加に伴って明らかに減少している。又、グラフト量の効果は中空糸膜の透過性によっても異なることが認められる。

接触相活性化、即ちKallikrein活性を調べた結果を図8-5に示す。コントロールとして同時に測定したカオリンでは有意なAMC濃度の上昇が認められたが、セルロース膜における接触相活性化はPEG鎖グラフトの有無に依らず認められなかった。

C5aの測定は、補体の活性化度を表す指標として非常に有効である。C5a産生のインキュベーション時間の依存性を見た結果を図8-6に示す。又、表8-1に示したようにC5a産生量はPEG鎖グラフト量の増加に伴って明らかに抑制されていることが解る。

#### [8-4] 考 察

材料表面において活性化され、表面に付着した血小板の定量方法は種々の方法が報告されており、従来次の2つの方法が主に用いられている<sup>(8)</sup>。一つは電子顕微鏡による観察法であるが、この方法は観察サンプルの調整に時間を要することに加え、観察エリアを極小部に限定せざるを得ないという制限がある。二つ目の方法は、クロミウム-50、或いはインヂウム-111でラベルする方法であるが、アイソトープの使用には特別な設備が必要となる。Tamadaらは簡便で信頼性のある方法を報告している<sup>(9)</sup>。この方法の原理は、活性化して材料表面に付着した血小板の細胞壁を溶解し、放出されたLDH(Lactate dehydrogenase)活性を測定することに基付いている。この方法は、測定サンプルエリアを大きく取れ、且つ簡便に精度良く付着血小板量を定量し得るのが特徴である。従って、我々はこの方法の中空糸膜サンプルへの応用方法を検討した。

中空糸膜での測定の再現性と信頼性を保証するためには、インキュベーション条件、遠心脱液条件、ヘパリン添加量が重要な要素であり、これらの条件の最適化を行った。

400Gの遠心力によっても脱離されない血小板は材料表面に非常に強固に付着した血小板である。これら強固に付着した血小板を電顕観察すると、成長した偽足により材料表面に強く固着している様子が観察される。活性化されて表面に付着している血小板と、単にルースに付着した血小板は遠心法によって確実に分離出来ることを確認した。水溶性PEG鎖を材料表面にグラフト結合させることによって、血液成分と材料表面との相互作用を抑制する効果が期待される<sup>(2, 3, 10)</sup>。この方法を採用した血液透析膜が、補体の活性化を効果的に抑制し、臨床において優れた血液適合性を示すことは前述した<sup>(5, 6)</sup>。

Akizawaらは低透過性のセルロース膜の場合、約100ppmのPEG鎖グラフトにより透析治療における補体の活性を抑制することを報告している<sup>(6)</sup>。本研究では、更に透過性の高いセルロース膜についてこの方法の有効性を調べた。

PEG鎖グラフトを行った高透過性セルロース膜の血小板付着の結果を図8-4に示すが、PEG鎖グラフト量の増加に伴って血小板の付着量は減少している。



しかしながら、血小板付着量は PEG 鎖のグラフト量のみ依存しているのではなく、中空糸膜のフラックスにも依存している。これは透過性が異なる膜では分子レベルでは表面構造が異なっていることを示唆する結果である。透過性は膜の空孔率に依存している為、血液成分が接触する膜の表面積も同時に変化していることに依るものであらうと考えられる。

ガラスやカオリン、或いは陰性電荷を持った材料表面との接触による接触相血液凝固は、フィブリン生成における酵素カスケード反応でもたらされることが知られている。この接触相活性化は第 X II 因子の活性化によって誘引されている。活性化された X II 因子はプレカリクレインをカリクレインに転換する。このカリクレインは、(Z-Phe-Arg-MCA) によって検知することが出来る。セルロース膜は血液凝固系接触相を活性化しないことは既に報告されている<sup>(11, 12)</sup>。

PEG 鎖グラフトセルロース膜の接触相活性化は、セルロース膜と同様に、図 8-5 に示されるようにグラフト量を増加させた場合においても活性化挙動は認められなかった。

セルロース膜の補体活性化は、表面の水酸基との相互作用に依るものと考えられている。補体の活性化は C3a, C5a の産生を伴う。実際の臨床血液透析で測定される C3a, C5a は、透析開始後約 15 分でピークを示し、その後透析前値に戻る。産生のレベルは C3a が高く C5a のレベルが低い。C5a のレベルが低くなるのは単核細胞が持つレセプターに結合されるためであらうと考えられる。本研究のように、血漿の場合にはこのレセプターが存在しないので、精度の高い測定が可能である。表 8-1 に示したように C5a の産生はグラフト量の増加に伴って抑制されており、高透過性のセルロース膜においても補体活性は PEG 鎖グラフトによって抑制出来る事が結論できる。

血小板付着量、凝固系接触相活性化、そして補体活性化に関して、PEG 鎖グラフトによるセルロース膜の改質法は有効に作用しており、グラフト量最大 850ppm まで逆効果は無く、グラフト量の増加に伴ってセルロース膜の生体適合性が改良されていることが確認された。少量のグラフト量でこのように顕著な変

化が見られるのは、実際に血液が接触する中空糸膜の表面層のみにグラフト反応が限定されていることによるものと考えられる。

中空糸内表面に付着した血小板付着量の定量法を確立し、PEG 鎖グラフトを行った高透過性セルロース膜での生体適合性挙動を精査した。その結果、PEG 鎖グラフト法は高透過性膜にも有効であり、血小板付着量、及び補体活性を有意に抑制し得ることを確認した。更に、850ppm までグラフト量を増加させたサンプルについても逆効果は認められず、グラフト量の増加に伴って、血小板付着量、補体活性共に抑制され、接触相活性化も無く血液適合性は改良された。即ち、PEG 鎖グラフトによるセルロース膜の表面改質は生体適合性の向上に極めて有効であることが結論できる。

表 9 - 1 . 中空糸膜サンプルの仕様と血小板付着量, C 5a産生量, 接触相活性化量の測定結果

Model	Membrane	UFR	Grafting amounts of PEG acid (ppm)	Number of platelets adhered ( $\times 10^5\text{cm}^{-2}$ )	C5a generation (ng/ml)	Contact phase of coagulation activity ( $\mu\text{M}$ )
C-1	Cellulose	5.0	0			$8.1 \pm 0.4$
C-2	Cellulose	19.3	0	$9.33 \pm 0.39$	$398 \pm 26$	$8.3 \pm 0.3$
AM-BIO	PEG-grafted cellulose	5.0	150	$1.59 \pm 0.51$	$148 \pm 14$	
P-1	PEG-grafted cellulose	19.3	100	$8.77 \pm 0.91$	$200 \pm 22$	$8.4 \pm 0.4$
P-2	PEG-grafted cellulose	19.3	200	$5.37 \pm 2.61$	$170 \pm 18$	$8.3 \pm 0.1$
P-3	PEG-grafted cellulose	19.3	300	$4.95 \pm 1.82$	$160 \pm 20$	$7.8 \pm 0.6$
P-4	PEG-grafted cellulose	19.3	470	$2.29 \pm 0.44$	$145 \pm 11$	$8.3 \pm 0.2$
P-5	PEG-grafted cellulose	19.3	865	$1.45 \pm 0.23$	$138 \pm 6$	$8.4 \pm 0.3$
Control	(Blank bovine plasma)					$7.3 \pm 0.2$
Control	(Kaolin)					$72.0 \pm 9.5$

UFR ( $\text{ml/mmHg/hr/m}^2$ ) is the permeability of dialyzer membranes to water *in vitro*.  
Kaolin is the negatively charged particle, which is well-known to activate the contact phase of blood coagulation.

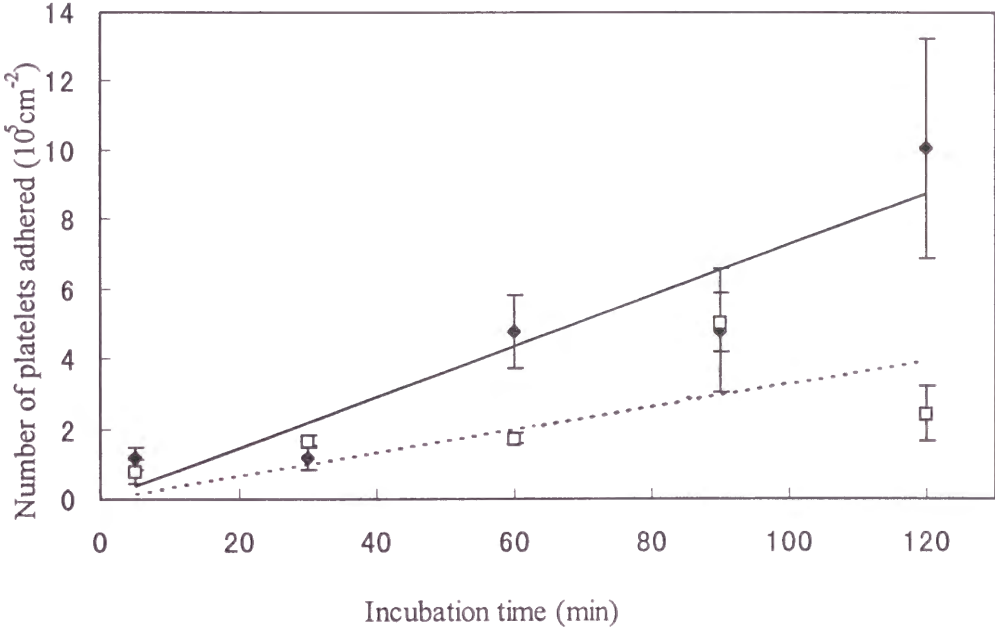


図 9 - 1 . 血小板付着量のインキュベーション時間依存性  
(◆) Low-flux cellulosic membrane  
(□) PEG-grafted low-flux cellulosic membrane(AM-BIO)  
(遠心脱離力:  $400\times\text{g}$ , ヘパリン添加量:  $2.0\text{unit/ml}$ )

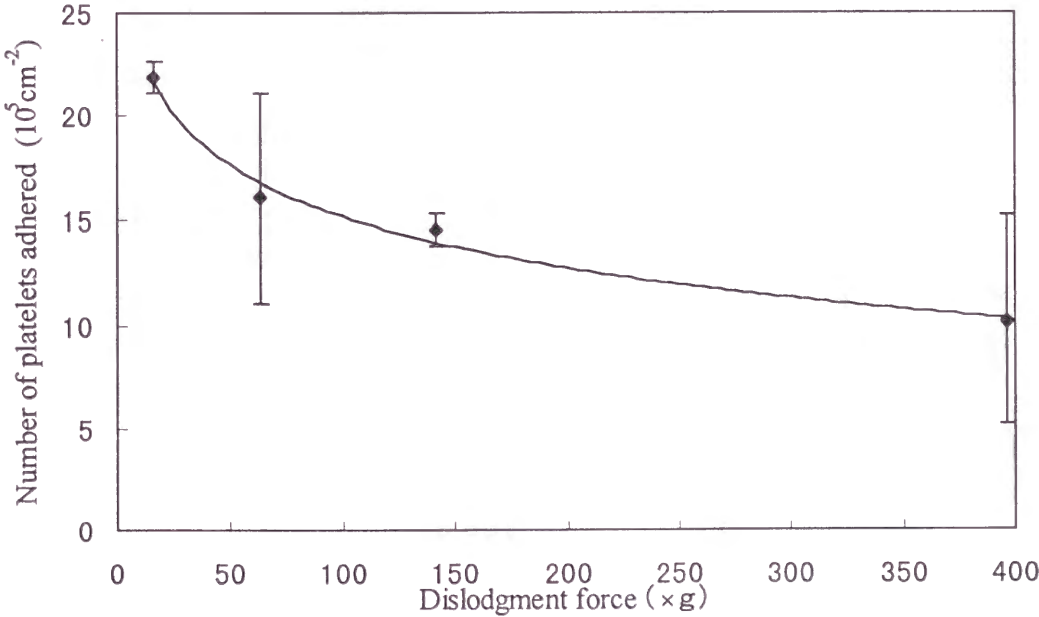


図 9 - 2 . 血小板付着量の遠心脱離力依存性  
(ヘパリン添加量:  $2.0\text{unit/ml}$ , インキュベーション時間: 60分)

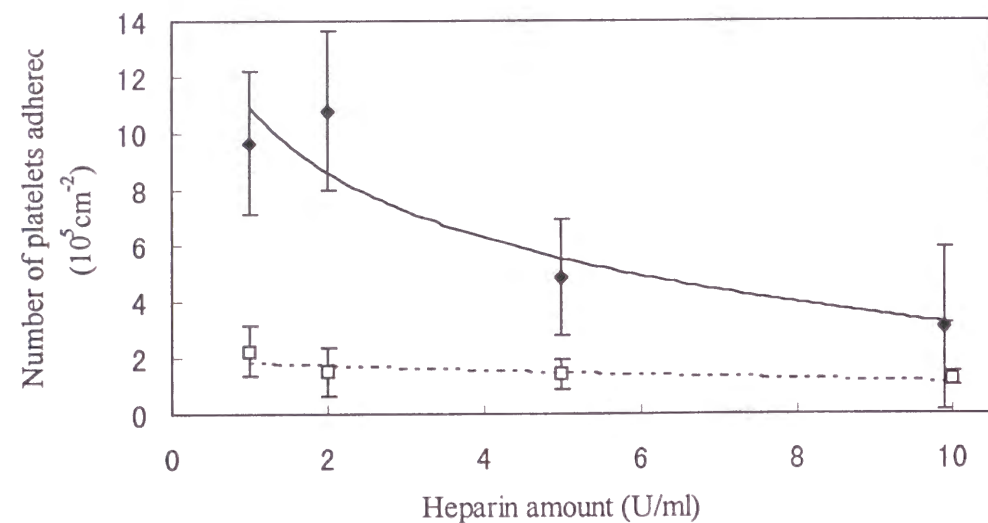


図9-3. 血小板付着量のヘパリン添加量依存性

(◆) Low-flux cellulosic membrane

(□) PEG-grafted low-flux cellulosic membrane (AM-BIO)

(遠心脱離力: 400×g, インキュベーション時間: 60分)

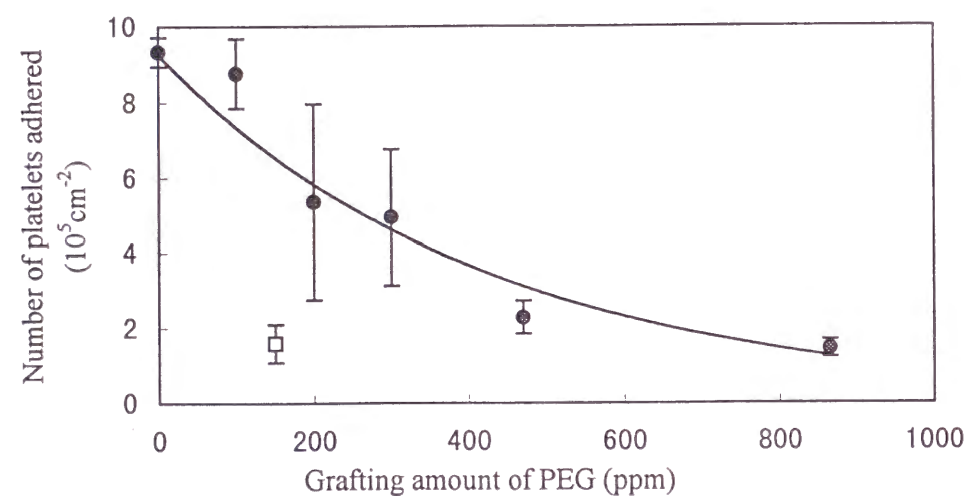


図9-4. 血小板付着量のPEG鎖グラフト量依存性

(◆) PEG acid-grafted low-flux cellulosic membrane (AM-BIO)

(□) PEG acid-grafted high-flux cellulosic membrane

(遠心脱離力: 400×g, ヘパリン添加量: 2.0 unit/ml, インキュベーション時間: 60分)

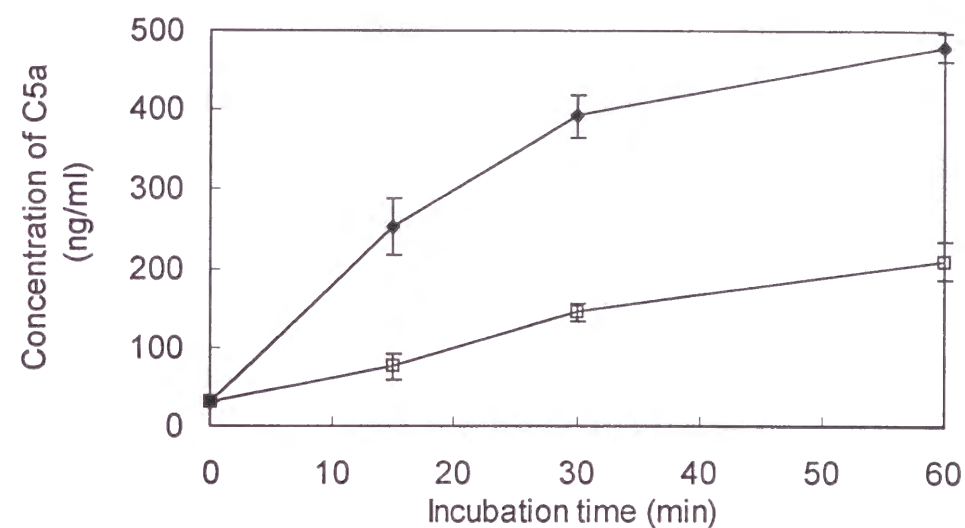


図9-5. C5a産生量のインキュベーション時間依存性

(◆) High-flux cellulosic membrane

(□) PEG acid-grafted high-flux cellulosic membrane

(グラフト量: 470 ppm)



## 参考文献

- (1)Richaed N.et al. Acute symptoms during and between hemodialysis: the relative role of speed,duration and biocompatibility of dialysis. Artif.Organs 1994,vol.18, 880-887
- (2)Ikada Y. Blood compatible polymers. Advances in Polymer Science 1984,vol.57,103-140
- (3)Han DK.,Park KD.,Ahn K.D.,Jeong SY and Kim YH. Preparation and surface characterization of PEO-grafted and heparin immobilized polyurethanes. J.Biomed.Mater.Res.,1989,vol.23,87-104
- (4)Kishida A, Mishima K, Corretge E, Konishi H. Ikada Y. Interaction of poly(ethylene glycol) grafted cellulosic membranes with proteins and platelets Biomaterials, 1992, vol.13, 113-118
- (5)Akizawa T. Kino K. Koshikawa S. Ikada Y. Kishida A. Yamashita M. Imamura K., Efficiency and Biocompatibility of a polyethylene glycol grafted cellulosic membrane during hemodialysis. ASAIO Trans., 1989,vol.35 333-335
- (6)Akizawa T. Kino K. Kinugasa E. Koshikawa S. Ikada Y. Kishida A. Hatanaka Y. Imamura K. Clinical effects of a polyethylene glycol grafted cellulosic membrane on thrombogenicity and biocompatibility during hemodialysis. ASAIO Trans., vol.36, M640-M642
- (7)Stolzenbach F. Methods Enzymol 1966,9,278-288,Academic Press, Orland,Fla,USA
- (8)Packham MP. The behavior of platelets at foreign surfaces. Proc Soc Exp Biol Med 1988, 189,261-274
- (9)Tamada Y. Kulik EA. Ikada Y. Simple method for platelet counting. Biomaterials 1995, 16, 259-261
- (10)Desai NP and Hubbell JA. Solution technic to incorporate polyethylene oxide and other water soluble polymers into surfaces of polymeric biomaterials. Biomaterials 1991, 12 144-153
- (11)Deppish R. Contact phase activation in dialysis, relation between membranes surface properties and activation mechanism. Blood Purif. 1992, 10, p87
- (12)Vaziri N.D. Effect of hemodialysis on contact group of coagulation factors. platelet and leukocytes. 1984, 77, 437-441

## 第9章 結論

### 〔9－1〕PEG鎖グラフト改質法再生セルロース透析膜の生体適合性

PEG鎖グラフト改質法による再生セルロース透析膜の生体適合性機能の発現メカニズムは、透析膜表面の「散漫層」の形成によるものとして概念的に説明がされてきたが、本研究においてセルロース膜表面に「水和ゲル層」が形成されていることが分子動力学計算によって検証された。膜表面に形成された「水和ゲル」層、即ち「散漫層」が流動下にある血中成分と膜表面の直接的な相互作用を緩衝し、血中成分の刺激を抑制する結果、生体適合性効果が発現されるものと考えられる。このことは、血中蛋白の膜への付着状態を比較した結果からも示唆されている。即ち、PEG鎖グラフトにより改質された再生セルロース膜に付着された蛋白の付着強度は、改質されていない場合に較べると極めて低く、容易に脱離されることから伺える。

又、透過性が低い従来のセルロース膜についてPEG鎖グラフト改質法の生体適合性効果は臨床的にも多く報告されていたが、透過性を改良した高透過型再生セルロース膜にも有効であることが本研究によって検証された。更に、「散漫層」の生体適合性効果は、従来から報告されている補体活性抑制のみではなく、凝固系活性化抑制の効果、即ち血小板活性度を表すLDH (Lactate Dehydrogenase) 放出量が大幅に低減され、且つ接触相活性化も認められないことが本研究により明らかとなった。

### 〔9－2〕再生セルロース膜の製膜技術

(銅アンモニアセルロース溶液の凝固過程制御)

従来、セルロース透析膜は上述の生体適合性の問題に併せ、透過性の問題、即ち透析アミロイド症原因物質である小分子量蛋白 ( $\beta$  2-Micro Globline) の除去能に大きな制限があった。血液透析用再生セルロース中空糸膜は銅アンモニアセルロース溶液の湿式紡糸により製造されているが、膜構造、即ち膜壁の孔構造は主にセルロース溶液

の凝固過程において決定されている。本研究では、この凝固過程における支配原理として、銅アンモニアセルローズ溶液と凝固液界面に発生する界面電位に着目した研究を行い、凝固液素性がアルカリ水溶液、酸性水溶液、中性塩水溶液の場合において凝固メカニズムは次の3つに分類されることを見出した。即ち、(1)H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,HCl,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等の酸性水溶液を凝固液として用いた場合は、凝固液側に負の電位が発生し、セルローズ溶液から凝固液への銅イオンの拡散輸送が促進される脱銅型凝固。(2)水酸化ナトリウムのようなアルカリ水溶液を凝固液とした場合には、銅アンモニアセルローズ溶液側に負の電位が発生し、凝固液側からセルローズ溶液側へのナトリウムイオンの輸送が促進され、セルローズとナトリウム間の複合体形成により凝固が進行するノルマン化型凝固。(3)塩化カリウムのような中性塩水溶液を凝固液とした場合には、銅アンモニアセルローズ溶液から凝固液へのアンモニアの拡散脱離により凝固が進行するアンモニア脱離型凝固。以上の3つのグループに分類される。このそれぞれの凝固特性を組み合わせることにより再生セルローズ膜の透過性、即ち孔径制御の範囲を大きく広げることが本研究によって可能となった。

### 〔9－3〕血液透析膜の孔構造設計

血液透析用中空糸膜の膜壁孔構造について、(1)「均一構造」、(2)「グラジエント構造」、(3)「逆グラジエント構造」、(4)「対称グラジエント構造」の4種の孔構造バリエーションを持つサンプルを、前述の銅アンモニア溶液の凝固速度制御の原理に基いて作製し、それぞれの特性を比較検討した。その結果、溶質透過抵抗の効率的な低減、血中蛋白の捕捉・付着量の極小化、透析液側から血液側へのバックフィルトレーションの極小化の観点から、「対称グラジエント孔構造」が血液透析中空糸膜の孔構造として最も優れていることが明らかになった。即ち、「対称グラジエント孔構造」では孔径の小さい内外表面層が透過の制御層或いは活性層としての機能を、孔径の大きい中間層は支持体層としての機能を担っている。従って、分画性(分子サイズ選択性)は高く維持しつつ透過抵抗は極小化されている(図6-5.)。又、内表面層の孔径は、血中蛋白成分の浸入を阻止する孔径に設計されている為、血中蛋白の捕捉(目詰まり)量

は、透過性が高いにも拘わらず従来膜のレベルが維持されている(表6-3.)。更に、高透過性血液透析膜の宿命的な課題として認識されてきた透析液側からのバックフィルトレーション即ち、エンドトキシン等、パイロジェン物質の逆流を抑制出来ることは、今後の血液透析治療に大きく貢献し得ることが期待されるものである。

### 〔9－4〕高透過性と生体適合性の両者を備えた再生セルローズ血液透析膜

本研究の主目的である生体適合性と高透過性の両者を改良した再生セルローズ膜〔AM-BC-F〕について、in-vitro 評価と臨床評価を行った。

in-vitro 評価においては、透過性指標として分画分子量特性、生体適合性指標として従来の補体活性を始め、血小板活性、接触相活性化を評価したが、何れにおいても初期目標を満足し得る結果が確認された。臨床評価において確認された小分子量蛋白β<sub>2</sub>-MGの除去率は30%に及んでおり、白血球数の変化は最小値においても対前値60%以上の値であった。in-vitro 評価で確認された血小板活性の抑制、接触相活性の抑制の臨床的な効果の確認は今後の課題であるが、高透過性再生セルローズ膜に対してもPEGグラフト改質法が有効に作用し得ることがin-vitro 評価と臨床評価において実証され本研究の目的が成就された。

本論文に関する研究報告

[第1章]

- 1) 日本膜学会誌 「膜」 vol.19(6), 420-422(1994)  
「セルロース透析膜の開発」  
笠井秀俊、渡邊哲夫、日吉辰夫

[第2章]

- 2) 「腎と透析」 vol.38 別冊 ハイパフォーマンスマテリアル'95, 70-73(1995)  
「透析膜の付着蛋白に関する検討」  
笠井秀俊、中山真理子、渡邊哲夫、日吉辰夫

[第3章]

- 3) 日本膜学会誌 「膜」 vol.19(6), 369-375 (1994)  
「血液透析膜の構造と溶質透過性」  
渡邊哲夫、伏見文良、日吉辰夫、山下康彦

[第4章]

- 4) Journal of Applied Polymer Science, Vol.59,15-21(1996)  
「 Role of Interfacial Potential in Coagulation  
of Cuprammonium Cellulose Solution 」  
Fumiyoshi Fushimi, Tetsuo Watanabe, Tatsuo Hiyoshi

[第5章]

- 5) 「腎と透析」 vol.40 別冊 ハイパフォーマンスマテリアル'96, 26-30(1996)  
日吉辰夫

[第6章]

- 6) 日本膜学会誌 「膜」 vol.22(2), 74-80 (1997)  
「対称グラジエント型セルロース血液透析膜の構造と特性について」  
日吉辰夫、宮崎誠、福田誠
- 7) 人工臓器 26(1), 165-170 (1997)  
「対称グラジエント孔構造セルロース膜 P T - X の構造と各種特性」  
宮崎誠、福田誠、日吉辰夫

[第7章]

- 8) 人工臓器 投稿中  
「PEG グラフト再生セルロース膜 "AM-BCF" の特徴」  
福田誠、宮崎誠、日吉辰夫

[第8章]

- 9) Artificial Organs, 投稿中  
「 Biocompatibility of PEG acid-grafted high-flux cellulosic membrane 」  
Fumiyoshi Fushimi, Mariko Nakayama, Tatsuo Hiyoshi



## 謝辞

本研究は旭化成工業(株)繊維事業部門ハローファイバー工場技術開発室にて1993年から1997年に亘り行ったものであります。その間、同工場技術開発室に在籍された諸氏には本研究の遂行において多大なる御協力と支援を得ましたことに深く感謝申し上げます。特に、協同研究者である同室の宮崎誠、福田誠、伏見文良、笠井秀俊、中山真理子、渡邊哲夫の諸氏には格別の感謝の意を表します。又、終始有益な助言と指導を頂いたハローファイバー工場長 溝口隆久氏を始め、同工場の諸氏と諸先輩方に厚くお礼申し上げます。

人工腎臓モジュールの成形、臨床評価等において多大なる支援と御協力を頂いた旭メディカル(株)の諸氏、更に電子顕微鏡観察を始めとする膜構造解析、並びにコンピューターシミュレーションにおいては旭化成工業(株)研究開発本部基盤技術センター諸兄の多大なる御協力と支援を得ましたことに厚くお礼申し上げます。

私は、1977年より20年間に亘り旭化成工業(株)におきまして、イオン交換膜プロセス、そして血液透析膜分野の研究開発の仕事に携わって参りました。その間におきまして、多くの諸先輩や同僚に支えられ、多大な薫陶を得ましたことに心より深く感謝申し上げます。

又、本研究の基盤であるポリエチレングリコール鎖による生体適合性の改良方法について基礎研究の段階より終始有益な御指導を賜り、且つ本研究論文の纏めにあたり懇篤な御指導、御教示を頂きました京都大学生体医療工学研究センター教授 筏 義人先生に深く感謝申し上げます。

1998年 1月

日吉辰夫